

EINFLUSS VON ENZYMINDUKTION, ENZYMINHIBIERUNG
UND CHEMISCHER STRUKTUR AUF DEN OXIDATIVEN
METABOLISMUS DES DIAZEPAM UND SEINER ANALOGEN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

HANS-JOACHIM SCHWANDT
aus Berlin

Berlin 1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543105_0027

EINFLUSS VON ENZYMINDUKTION, ENZYMINHIBIERUNG
UND CHEMISCHER STRUKTUR AUF DEN OXIDATIVEN
METABOLISMUS DES DIAZEPAM UND SEINER ANALOGEN



INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

HANS-JOACHIM SCHWANDT

aus Berlin

Berlin 1973



1. Referent: Privatdozent Dr. K.-H. Beyer
2. Referent: Professor Dr. K.-H. Frömming

Tag der mündlichen Prüfung: 9.4.1973

Tag der Promotion: 9.4.1973

Meiner lieben Renate gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Für die Anleitung der Arbeit und die wohlwollende Unterstützung danke ich Herrn Privatdozent Dr. K.-H. Beyer sehr herzlich.

Den Herren Dr. W. Sadée, z.Zt. University of Southern California, und Herrn Privatdozent Dr. A.G. Hildebrandt, Institut für Klinische Pharmakologie im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin, schulde ich Dank für fruchtbare Anregungen und Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

A	Einleitung	Seite
I	Metabolismus	1
II	Pharmakologie von 1,4-Benzodiazepinen	5
III	Pharmakokinetik von 1,4-Benzodiazepinen	5
IV	Struktur-Wirkungsbeziehung	9
V	Bekannte enzymatische Umwandlungen von 1,4-Benzodiazepinen	10
VI	Chemie des Benzodiazepin-Gerüsts	11
VII	Problemstellung	12
B	Synthese und Analytik der verwendeten 1,4-Benzodiazepin-Derivate	
I	Zur Inkubation verwendete 1,4-Benzodiazepine	14
II	Referenzsubstanzen zur Identifizierung der Metaboliten	15
III	Syntheschema der 3-Methylanalogen des Diazepam	16
IV	Syntheschema der hydroxilierten Benzophenone	17
V	Syntheschema der Chinazoline und Chinazolinone	17
VI	Analytische Verfahren zur Identifizierung von 1,4-Benzodiazepin-Metaboliten	18
VII	Physikalisch-chemische Eigenschaften von 1,4-Benzodiazepin-2-onen	20
	1. UV	20
	2. Fragmentierung der Benzodiazepine und ihrer Metaboliten im Massenspektrum	20
	3. Fragmentierung der Benzophenone als Hydrolyseprodukte von 1,4-Benzodiazepinen im Massenspektrum	23
	4. NMR-Konformation unsymmetrisch substituierter 1,4-Benzodiazepine	24
	a) Diskussion	33

C	Identifizierung der Metaboliten aus Rattenleber- mikrosomen-Inkubationen von Diazepam (IV), 3-Methyl-Diazepam (XII) und N-1-Nor-3-methyl- Diazepam (XIII)	Seite
---	--	-------

I	Oxidativer Metabolismus
---	-------------------------

1.	Einführung	34
2.	Identifizierung der Metaboliten von IV	34
3.	Identifizierung der Metaboliten von XII	39
4.	Identifizierung der Metaboliten von XIII	46
5.	Diskussion	53

II	Metabolische Umlagerungen von 1,4-Benzodiazepinen durch Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen
----	--

1.	Einführung	55
2.	Strukturaufklärung der Metaboliten von IV, XII und XIII	56
3.	Präkursoren der Chinazolinone XVIII und XIX	64
4.	Präkursoren der Chinazoline XV und XIII ₇	67
5.	Artefakte	67
6.	Diskussion	68

D	Einfluß der Enzyminduktion und des Metyrapon auf den in vitro Metabolismus von Diazepam (IV), 3-Methyl-Diazepam (XII), N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII) und Medazepam (XIV)
---	--

I	Einführung	74
---	------------	----

II	Einfluß der Enzyminduktion auf den Metabo- lismus von IV, XII, XIII und XIV	77
----	--	----

1.	Diazepam (IV)	77
2.	3-Methyl-Diazepam (XII)	80
3.	N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII)	82
4.	Medazepam (XIV)	84

III	Einfluß von Metyrapon auf die Enzymaktivität
-----	--

1.	bei induzierten Mikrosomen	87
a)	Diazepam (IV)	87
b)	3-Methyl-Diazepam (XII)	89
c)	N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII)	91
d)	Medazepam (XIV)	92
2.	bei nicht induzierten Mikrosomen	94

	a) Diazepam (IV)	94
	b) 3-Methyl-Diazepam (XII)	96
	c) N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII)	98
	d) Medazepam (XIV)	100
IV	Diskussion	101
E	Experimenteller Teil	
I	Geräte	108
II	Chemikalien und Lösungen	110
III	Methoden	110
	1. DC-Trennung der Modellssubstanzen	110
	2. DC-Trennung der Benzophenone	112
	3. DC-Isolierung und Aufreinigung der Metaboliten	113
	4. Auswertung der DC-Scans	115
	5. Hydrolysebedingungen von XII, XIII und XX	119
	6. Hydrolyse der Substrate und Metaboliten	121
	7. Aufarbeitung der Rattenleber	121
	8. Inkubationsmischung und Inkubationsbedingungen	123
	9. Aufarbeitung des Inkubationsansatzes	124
	10. Bratton-Marshall-Reaktion	125
IV	Synthesen der Substrate und Metaboliten	126
F	Zusammenfassung	135
G	Literaturverzeichnis	138

A Einleitung =====

In der vorliegenden Arbeit wird der in vitro Metabolismus einiger 1,4-Benzodiazepine untersucht. Diazepam und einige seiner Analogen wurden als Modellsubstanzen zur Untersuchung des Mechanismus von Metabolisierungsreaktionen verwendet, weil das chemische, biochemische und pharmakokinetische Verhalten dieser Stoffklasse weitgehend bekannt war.

Zur Einführung in die Arbeit folgt eine Erörterung dieser therapeutisch wichtigen Stoffklasse und des Arzneimittel-metabolismus allgemein.

I Metabolismus

Als Metabolismus bezeichnet man die Umwandlung von exogenen und endogenen chemischen Substanzen im lebenden Organismus. Die gebildeten Stoffwechselprodukte werden als Metaboliten bezeichnet.

Metaboliten von Arzneistoffen werden häufig aufgrund ihrer größeren Polarität schneller als ihre Ausgangsstoffe durch die Nieren ausgeschieden (1). Oft treten Paarungen mit Glucuronsäure und Sulfat auf (2, 3). In vielen Fällen tritt durch Metabolisierung eine Entgiftung der Arzneistoffe ein. Es sind jedoch auch Verbindungen bekannt, deren Metaboliten pharmakologisch wirksamer und stärker toxisch sind. Als Beispiel sei die carcinogene Wirkung verschiedener Metaboliten von Anilin-Derivaten genannt (4, 5). Die demethylierten Metaboliten von Chlorpromazin, Codein und Ephedrin wiederum zeigen ähnliche Wirkung wie die Ausgangsprodukte (6).

Enzymatische Oxidationen und Reduktionen sind häufige Metabolisierungsschritte (7, 8), die vorwiegend im endoplasmatischen Retikulum der Leber, aber auch der Niere, Lunge und im Gastrointestinaltrakt ablaufen (2). Der oxidative Arzneimittelabbau wird vorwiegend durch gemischt-funktionelle Oxigenasen bewirkt (9). Diese Oxigenasen benötigen Luftsauerstoff und reduziertes Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH) oder reduziertes Nicotinamidadenindinucleotid (NAD^+H) als Reduktionsäquivalent (10-12). Bei in vitro Untersuchungen werden NADPH-regenerierende Systeme verwendet, die dann mit Hilfe von Luftsauerstoff und Mikrosomenfraktionen Substrate hydroxilisieren, dealkylieren oder N- bzw. S-oxidieren. Die meisten oxidierenden Enzymreaktionen können als Hydroxilierungen formuliert werden (6):

Aromatische Hydroxilierung



Aliphatische Hydroxilierung



N-Dealkylierung



O-Dealkylierung



Desaminierung



Sulfoxidation



N-Oxidation



Im gemischt-funktionellen Oxigenase-System reduziert NADPH die Cytochrom P 450 Reduktase; diese überträgt die Reduktionsäquivalente auf einen bisher noch nicht identifizierten Faktor, der dann das Cytochrom P 450 reduziert. Das reduzierte Cytochrom P 450 bindet Luftsauerstoff. Dabei wird ein Atom des Luftsauerstoffes in Wasser überführt. Das zweite Atom, das durch Bindung an das Fe-Atom des Cytochroms resonanzstabilisiert ist, kann jetzt als "aktiver Sauerstoff" auf Substrate übertragen werden, die ebenfalls an das Cytochrom P 450 gebunden werden.

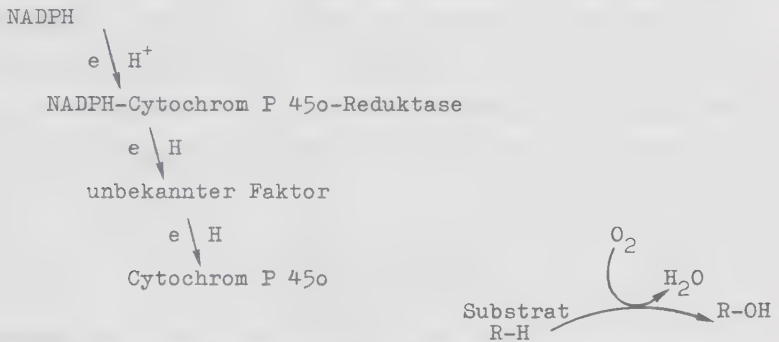


Abb. 1: Elektronentransportkette der gemischt-funktionellen Oxigenase

Das Cytochrom P 450 wird so genannt, weil es einen Komplex mit CO bildet, der bei 450 nm ein Absorptionsmaximum besitzt (13-15). Das Eisen im Kern des Cytochrom P 450 liegt in diesem Komplex als Fe^{2+} vor.

Unterschiede in Qualität und Quantität des Metabolismus ergeben sich durch die verschiedenen Tierspezies und z.B. durch den Geschlechtsunterschied innerhalb einer Gattung (16, 17). Auch durch parenterale oder orale Applikation einer Substanz können verschiedene Metaboliten entstehen, da die Gesamt-

menge der Substanzen bei oraler Gabe durch das Darm-Leber-System absorbiert wird (18). Die Verabfolgung von Phenobarbital, Barbital, Aminopyrin oder Phenylbutazon an Ratten führt zu einer Aktivierung des Metabolismus der Tiere durch Enzyminduktion (19). Der Mechanismus dieser Induktion ist noch nicht völlig geklärt. Stoffe wie Phenobarbital, 3,4-Benzpyren und 3-Methyl-chloranthracen, die im lebenden Organismus eine Induktion der Enzymaktivität bewirken, sind inaktiv, wenn sie in vitro zu Mikrosomenfraktionen zugesetzt werden (20).

1,4-Benzodiazepine erfahren im Körper einen relativ komplexen Abbau, der zu einer Reihe pharmakologisch wirksamer Metaboliten führt, die teilweise ebenfalls als Arzneimittel eingesetzt werden (21). Dies sei am Schema des Medazepam demonstriert (22).

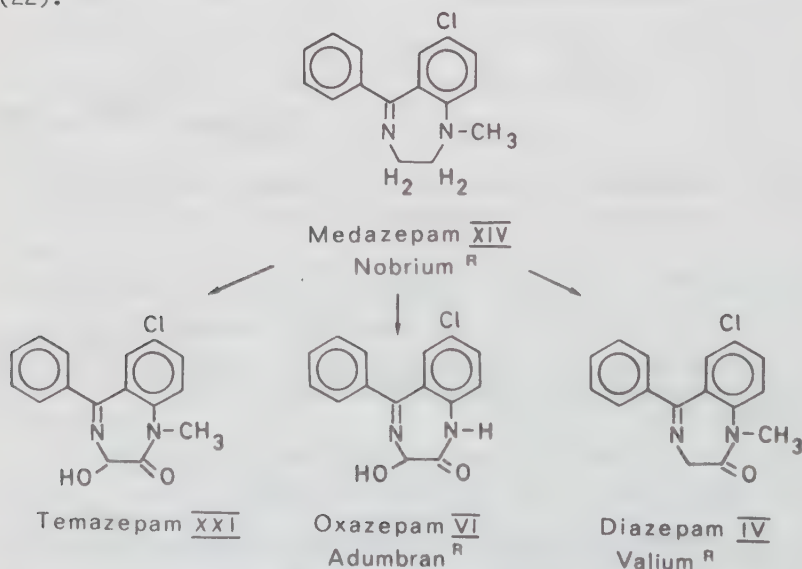


Abb. 2: Metabolismus des Medazepam (gekürzt)

Pharmakologie von 1,4-Benzodiazepinen

Das erste synthetisierte 1,4-Benzodiazepin war Chlordiazepoxid (23). Die Verbindung zeigte im klinischen Test interessante pharmakologische Eigenschaften, die durch den direkten, selektiven Angriff im Limbischen System bedingt sind (24). Neben der schwach ausgebildeten muskelrelaxierenden und antiepileptischen Wirkung fand man einen angstlösenden und sedierenden Effekt.

Das chemische Grundgerüst dieser Substanz diente als Modell für weitere Synthesen ähnlicher Verbindungen, wie Oxazepam, Nitrazepam, Diazepam, Medazepam etc. Diese 1,4-Benzodiazepine weisen jeweils verschiedene Schwerpunkte im Indikationsspektrum auf. Oxazepam hat schwach antikonvulsive und zentral angstlösende Wirkung (25) und ist noch weniger toxisch als Diazepam, das sich durch seine sedierende, muskelrelaxierende und antiepileptische Wirkung in der Therapie bewährt hat (26). Nitrazepam besitzt angstlösende Eigenschaften, ist ein sehr wirksames Antikonvulsivum (27) und wird vorwiegend als Einschlafmittel verwendet (28). Medazepam wirkt angstlösend und sedierend (29, 30). Flurazepam zeigte im Tierversuch antidepressive Wirkung (31). Beim Menschen entfaltet es ungewöhnlich starke hypnotische Eigenschaften (32, 33).

Pharmakokinetik von 1,4-Benzodiazepinen

Die Pharmakokinetik befaßt sich mit dem quantitativen Verhalten von Arzneimitteln bei Absorption, Verteilung im Organismus, dem Metabolismus und der Ausscheidung. Der Metabolismus der 1,4-Benzodiazepine ist von Interesse; das soll hier am Beispiel des Chlordiazepoxid (I) und des Diazepam (IV) er-

läutert werden.

Der Metabolismus und die pharmakokinetische Verteilung von Chlordiazepoxid (I) (34-41) und Diazepam (IV) (42-50) sind weitgehend untersucht worden und führten zur Identifizierung zahlreicher Abbauprodukte. Dabei ist festzustellen, daß nur wenige Metaboliten von I und von IV für deren pharmakologische Aktivität im Menschen verantwortlich sind.

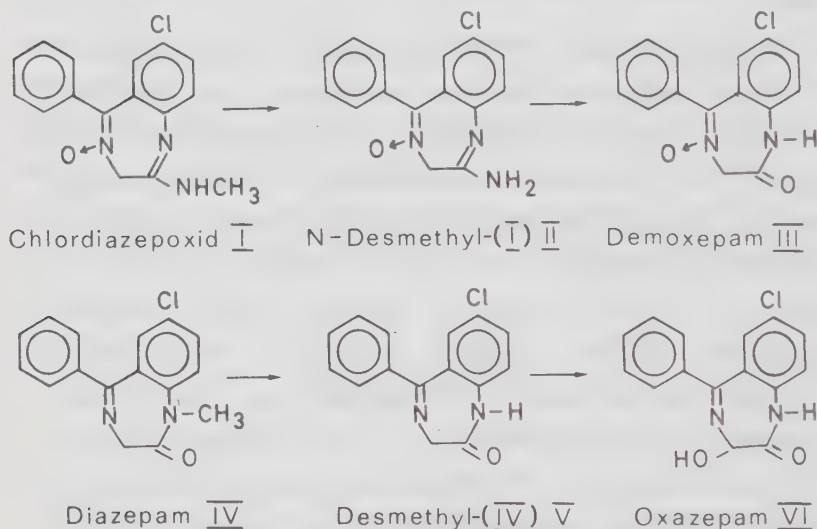


Abb. 3: Pharmakologisch wirksame Metaboliten des Chlordiazepoxid und des Diazepam

Chlordiazepoxid (I) wird im Menschen zu II demethyliert, dieser Metabolit wird wiederum zu Demoxepam (III) hydrolysiert (34-37). Nach einer einmaligen Gabe von Chlordiazepoxid (I) erreichte II Konzentrationen von etwa 10-40 % der Plasmakonzentration von I. Die Halbwertszeit von II im Menschen ist noch nicht beschrieben worden; eine Anhäufung

von II ist auch nach langer Behandlung mit I nicht zu erwarten. Die folgenden Halbwertszeiten von Chlordiazepoxid (I) und Demoxepam (III) sind im Menschen beobachtet worden (37):

	Chlordiazepoxid (I)	Demoxepam (III)
t/2 [Std.]	6,6 - 28	14 - 95

Dabei scheint nur ein geringer Teil Chlordiazepoxid (I) zu Demoxepam (III) metabolisiert zu werden. Daraus kann folgender Schluß gezogen werden:

Demoxepam wird bei wiederholter Gabe aufgrund seiner längeren Halbwertszeit im Körper kumulieren und auf diese Weise an der pharmakologischen Aktivität von Chlordiazepoxid teilnehmen. Die einmalige Gabe von Diazepam (IV) führt zu therapeutisch wirksamen Plasmakonzentrationen und dem demethylierten Metaboliten V.

Für IV und V wurden folgende Halbwertszeiten gefunden (46):

	Diazepam (IV)	Desmethyldiazepam (V)
t/2 [Std.]	20 - 42	42 - 96

Durch die langen Halbwertszeiten von IV und V wird es bei wiederholter Einnahme von Diazepam zu einer Kumulation von IV und besonders von V im Plasma kommen.

Das Glucuronid des Oxazepam stellt ein Hauptprodukt des Diazepam-Metabolismus im Harn des Menschen dar (43, 44, 46). Im Plasma des Menschen dagegen können weder 3-OH-Diazepam (XXI) noch Oxazepam (VI) in großen Mengen nachgewiesen werden (44). Die Benzodiazepine I und IV verteilen sich hauptsächlich im Körpergewebe und werden überwiegend an Proteine gebunden.

Dadurch werden sie nicht direkt durch die Nieren eliminiert, sondern zum überwiegenden Teil durch Metabolismus in polare Konjugate überführt, die dann über die Nieren zur Ausscheidung gelangen.

Wie festgestellt wurde, unterscheiden sich die Plasmakonzentrationen von Chlordiazepoxid (I) und Diazepam (IV) und deren Metaboliten bei den verschiedenen Patienten sehr stark. Erhebliche individuelle Unterschiede sind charakteristisch für lipophile Arzneistoffe wie die Benzodiazepine, die hauptsächlich durch den Metabolismus ausgeschieden werden. Genetische und umweltbedingte Faktoren, mikrosomale Enzyminduktion, körperlicher Zustand der Patienten und ähnliche Faktoren werden für das unterschiedliche biochemische Verhalten dieser Stoffe im Organismus verantwortlich gemacht.

Diese Ausführungen machen deutlich, daß die Biotransformation im Zusammenhang mit Kinetik von Bildung und Ausscheidung der Metaboliten gesehen werden muß. Im Urin aufgefundene Hauptmetaboliten liegen im Blut oft nur in geringen Konzentrationen vor und beteiligen sich somit nur geringfügig an der pharmakologischen Wirkung. Bei der Bewertung der in vitro Untersuchungen über den Metabolismus von Benzodiazepinen in der vorliegenden Arbeit muß daher berücksichtigt werden, daß sich nicht alle Ergebnisse auf das Geschehen im intakten Organismus übertragen lassen. Hierzu sind weitere pharmakokinetische Untersuchungen notwendig.

IV Struktur - Wirkungsbeziehung

Eine große Anzahl 1,4-Benzodiazepine hat den Tierversuch oder den klinischen Test nicht erfolgreich bestanden. Aus diesen Erfahrungen konnte man eine Struktur-Wirkungsbeziehung ableiten (51, 52). Dabei ergab sich, daß die Art der Substitution der Atome N₁, C₃, C₅, C₇ und C₂ im Benzodiazepin-gerüst entscheidend für die pharmakologische Aktivität ist.

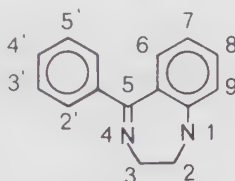


Abb. 4: Zählweise des Benzodiazepingerüstes (53)

Stellung im Ringsystem	Eigenschaftsänderung
N ₁	Methylierung erhöht die Wirkung
C ₂	Durch Einführung einer OH-Gruppe wird die zentral sedierende Wirkung abgeschwächt; aliphatische oder aromatische Substituenten vermindern die Aktivität
-N ₄ =C ₅ -	Doppelbindung gehört zum Wirkungsprinzip
C ₅	Substitution durch Phenyl- oder Pyridylgruppe (54) ist für die Aktivität notwendig
C ₇	Erhöhte Wirkung durch Substitution mit elektronenziehenden Substituenten wie Cl, CN, CF ₃ , NO ₂ (55)
C ₂	Substitution von F, Cl, führt zur Steigerung der Aktivität

Die in dieser Arbeit untersuchten 3-Methylanalogen des Diazepam (XII und XIII) sind aufgrund der Substitution in Stellung 3 pharmakologisch weniger aktiv (51). Betrachtet man die Relation der Wirksamkeit, so ist 3-OH-Diazepam (Temazepam) (XXI) wirksamer als 3-Methyl-Diazepam (XII).

VI Chemie des 1,4-Benzodiazepingerüsts

Grundbausteine einer Benzodiazepinsynthese sind substituierte Benzophenonoxime und α -Halogen-säurehalogenide, aus denen sich Chinazolin-N-oxide bilden (67), die dann durch Behandlung mit Basen unter Ringerweiterung zu Benzodiazepinen umgelagert werden (68). Eine weitere Möglichkeit der Synthese ergibt sich durch Zyklisierung N-Alkylamin-substituierter Benzophenone in organischen Lösungsmitteln (69).

Der 7-Ring im Benzodiazepingerüst kann Angriffspunkt für chemische Reaktionen sein, die zur Ringverengung, Ringöffnung, zu Azomethinen oder Benzophenonen führen (51, 70-75).

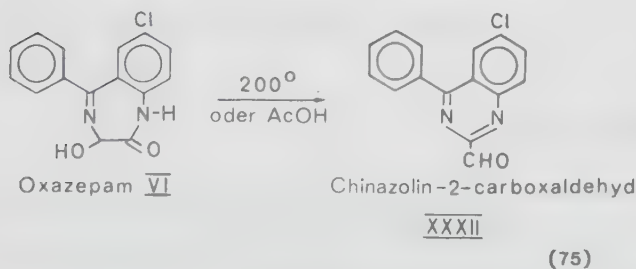
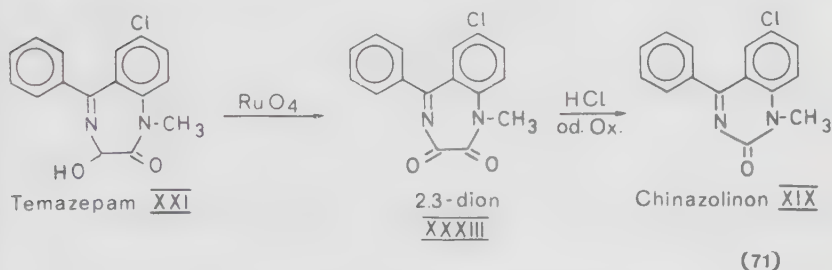


Abb. 6: Reaktionen des Heterocyclus im Benzodiazepingerüst (Teil I)

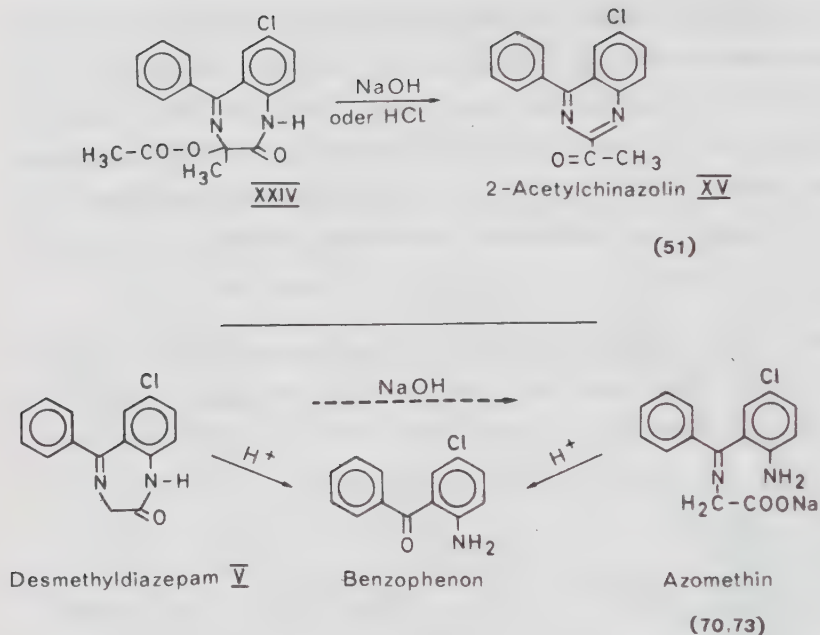


Abb. 6: Reaktionen des Heterocyclen im Benzodiazepingerüst
(Teil II)

Beim enzymatischen Abbau von 1,4-Benzodiazepinen werden teilweise auch Chinazolinone (76, 77) und Chinazoline gebildet, wie sie bei den vorstehend beschriebenen chemischen Reaktionen auftreten.

VII Problemstellung

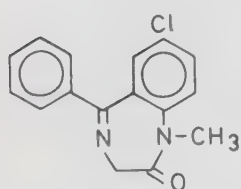
Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, den Mechanismus der mikrosomalen Oxygenierung am Beispiel des Diazepam und seiner 3-Methylanalogen zu untersuchen. In diesem Zusammen-

hang waren zunächst die Struktur der in vitro entstehenden Metaboliten und ihre Konzentrationen zu bestimmen, um so zu einem Metabolitenprofil der einzelnen Substanzen zu gelangen. Der Einfluß der sterischen Anordnung des Benzodiazepinringes, der Enzyminduktion durch Phenobarbital und der Inhibierung durch Metyrapon auf dieses Metabolitenprofil sollten aufgeklärt werden. Weiterhin sollten enzymatische Umlagerungen des 7-Ringes der Benzodiazepine mit analogen chemischen Umlagerungsreaktionen verglichen werden.

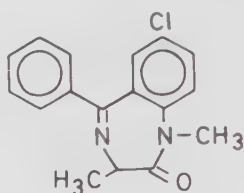
Synthese und Analytik der verwendeten 1,4-Benzodiazepin-Derivate

Zur Inkubation verwendete 1,4-Benzodiazepine

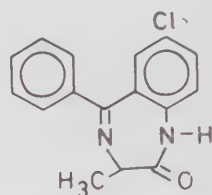
Die Abbildung 7 gibt eine Aufstellung der in dieser Arbeit zur Inkubation mit Rattenlebermikrosomen eingesetzten 1,4-Benzodiazepine. Die Substanzen wurden nach Literaturvorschriften hergestellt. Von der pharmazeutischen Industrie zur Verfügung gestellte Substanzen sind mit ⁺⁺ versehen.



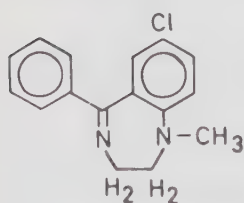
Diazepam IV ⁺⁺



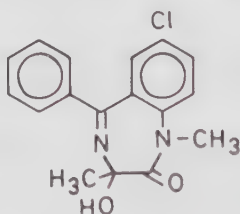
3-Methyl-Diazepam XII



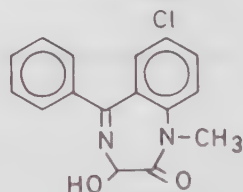
N-1-Nor-3-methyl-Diazepam XIII



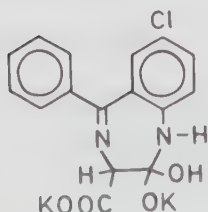
Medazepam XIV ⁺⁺



XX



3-OH-Diazepam XXI
Temazepam



Dikalium-Chlorazepat XXI ⁺⁺

Abb. 7: Zur Inkubation verwendete 1,4-Benzodiazepine

II Referenzsubstanzen zur Metabolitenidentifizierung

In der folgenden Abbildung 8 sind die Referenzsubstanzen aufgeführt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Analytik und Strukturaufklärung der gebildeten Metaboliten benutzt wurden.

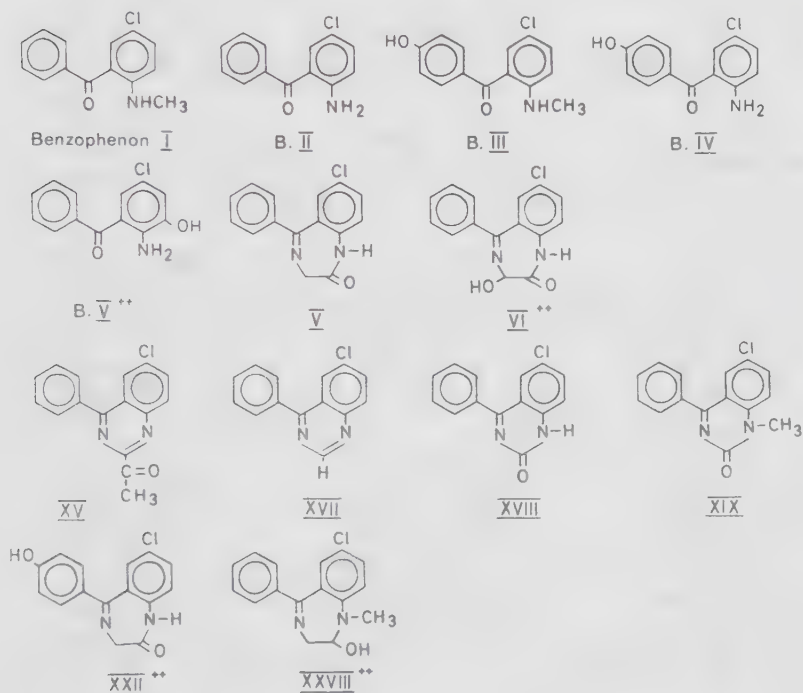


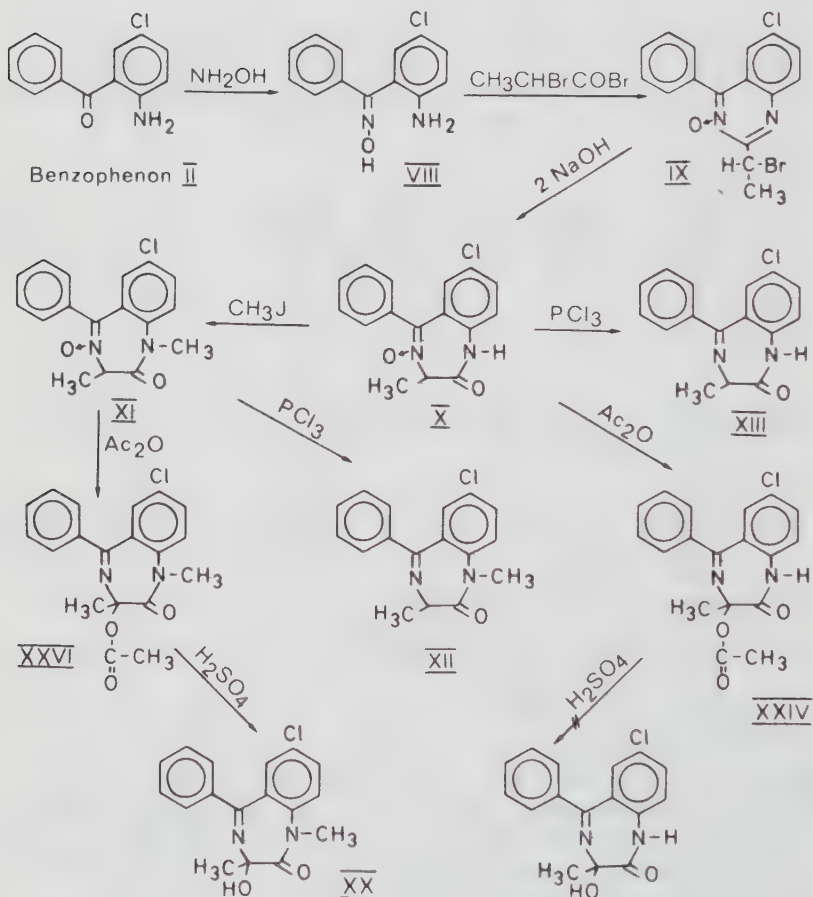
Abb. 8: Referenzsubstanzen zur Metabolitenidentifizierung

Die in den Aufstellungen unter B II - B V verwendete römische Bezifferung wird auch im weiteren Text anstelle der chemischen Bezeichnungen fortgeführt.

Bei der Bezeichnung der gebildeten Metaboliten ist die römische Ziffer Symbol für die inkubierte Substanz und die arabische Ziffer Symbol für einen bestimmten Metaboliten dieser Inkubation. So bedeutet "Metabolit IV₃", daß es sich um den Metaboliten 3 aus der Inkubation IV (Diazepam) handelt.

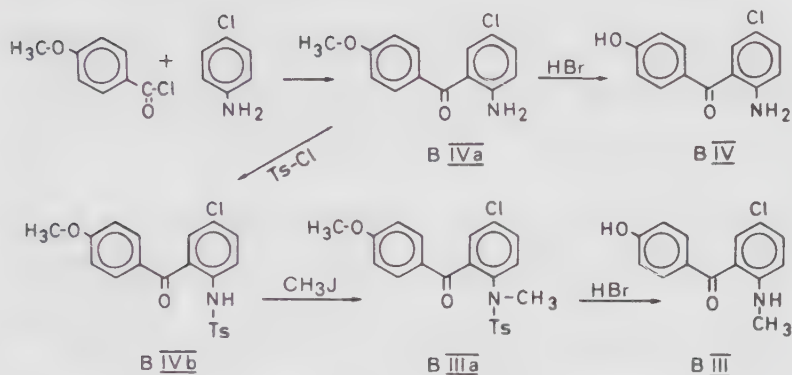
III Syntheschema der 3-Methylanalogen des Diazepam

(51.130-133)



IV Syntheschema der hydroxilierten Benzophenone

(125-127)

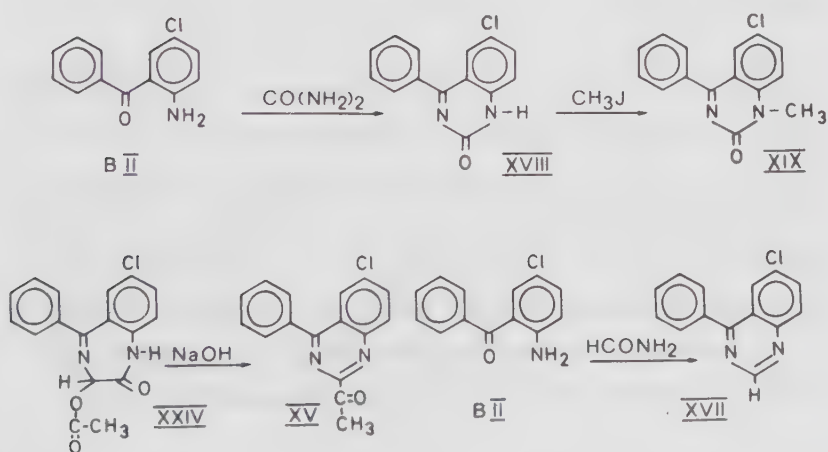


Ts = $p\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{-}$

B = Benzophenon

V Syntheschema der Chinazolinone und Chinazoline

(51,128,129)



Analytisches Verfahren zur Identifizierung von 1,4-Benzodiazepin-Metaboliten

Im Teil A V wurde bereits eine Übersicht über mögliche metabolische Veränderungen des Benzodiazepingerüsts gegeben. Im Folgenden soll der analytische Verlauf zur Strukturaufklärung von Benzodiazepin-Metaboliten unter besonderer Berücksichtigung der Lokalisierung enzymatisch eingeführter OH-Funktionen beschrieben werden.

Die Inkubate werden mit Äther bei pH 7,4 extrahiert und die Extrakte dünnenschichtchromatographisch in einem geeigneten Fließmittel aufgetrennt. Identische R_f-Werte der Metaboliten mit Referenzsubstanzen geben dabei erste Hinweise auf die chemischen Strukturen. Anschließend werden die Metaboliten mit einem UV-Scanner bei 320 nm direkt auf der DC-Platte gemessen und die Scans durch Flächenbestimmung der einzelnen Peaks quantitativ ausgewertet. Dann wird ein Teil der Metaboliten-Banden der Bratton-Marshall-Reaktion mit vorangegangener Hydrolyse unterworfen. Rosa bis rote Farbreaktionen der Metaboliten deuten auf N-1-demethylierte Strukturen hin. Zur anschließenden Anfertigung von NMR-, IR- oder Massenspektren werden die Metaboliten dünnenschichtchromatographisch weiter gereinigt. Der Vergleich der Massenspektren der Metaboliten und der Ausgangssubstanzen gibt die Möglichkeit der Charakterisierung der enzymatischen Reaktionen, z.B. Hydroxilierung oder Demethylierung. Die Fragmentierung im Massenspektrum hydroxilierten Metabolite ermöglicht weiterhin Aussagen über die Stellung der enzymatisch eingeführten OH-Gruppe. Hierbei läßt sich aber nur feststellen, ob in

Stellung 3 des Diazepinringes oder an den Aromaten hydroxi-
liert wurde. Um die Stellung der aromatischen OH-Gruppe fest-
zulegen, werden die Metaboliten zu Benzophenonen hydrolysiert.
Die entstandenen Benzophenone werden dünn-schichtchromato-
graphisch mit bekannten Benzophenonen verglichen. "Ring-
verengte" Metaboliten können unter den verwendeten Bedingungen
nicht zu Benzophenonen gespalten werden.

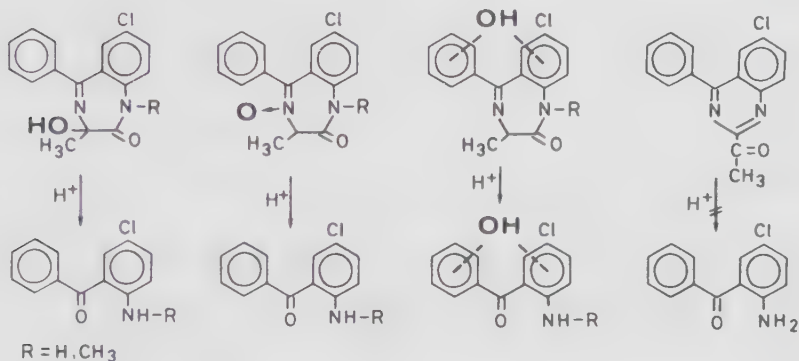


Abb. 9: Hydrolyseschema von Benzodiazepin-Metaboliten zur
Charakterisierung der enzymatischen Reaktion

Weiterhin wurden die entstandenen Benzophenone dünn-schicht-
chromatographisch aufgereinigt und Massenspektren angefertigt,
die aufgrund der Fragmentierung eine Lokalisierung der einge-
führten OH-Gruppe in den beiden Benzolkernen zulassen
(vergl. B VII 3).

VII Physikalisch - chemische Eigenschaften der 1,4-Benzodiazepin-2-one

1. UV

Die verwendeten 1,4-Benzodiazepin-2-one zeigen untereinander-ähnliche UV-Spektren. Die Lage der Absorptionsmaxima und die molaren Extinktionskoeffizienten werden durch Hydroxilierung oder Methylierung in Stellung N-1, C-3 und C-4' beeinflusst. Da die unterschiedlich substituierten Benzodiazepine bei keiner Wellenlänge gleiche molare Extinktionskoeffizienten aufweisen, mußten Eichgeraden zur Direktmessung der Absorption von der DC-Platte für die einzelnen Substanzen erstellt werden. Die Wellenlänge von 320 nm war geeignet, da hier nur wenige störende Verunreinigungen erfaßt werden. Bei dieser Methode konnten noch Metaboliten in einer Menge von ca. 0,1 µg nachgewiesen und annähernd quantitativ bestimmt werden.

2. Fragmentierung der 1,4-Benzodiazepine und ihrer Metaboliten im Massenspektrum

1,4-Benzodiazepine bilden im Massenspektrum Fragmente, die für diese Stoffklasse charakteristisch sind (64, 77, 79). Das Fragmentierungsmuster wird durch Substitution im 7-Ring beeinflusst und läßt Schlüsse auf die Anordnung der Substituenten zu. N-1 und C-3 unsubstituierte Verbindungen spalten primär CO ab. Bei N-1 methylierten 1,4-Benzodiazepin-2-onen beginnt der Abbau vorwiegend durch die Eliminierung von H_2CN aus dem Molekül. Durch 3-Methyl-Substitution kommt

es bevorzugt zu einer Abspaltung des C-3 mit seinem Substituenten. Weitere Fragmentierungen sind analog den beschriebenen Abbaureaktionen (78) von Benzodiazepinen ohne 3-Methylgruppe.

Die verwendeten 1,4-Benzodiazepin-Derivate sind in Stellung 7 durch Chlor substituiert. Durch das natürliche Mengenverhältnis der Chlorisotope 35 und 37 von etwa 3:1 ergibt sich ein charakteristisches Molekülion. Fragmente, in denen das Chlor noch enthalten ist, müssen ebenfalls dieses Verhältnis aufweisen.

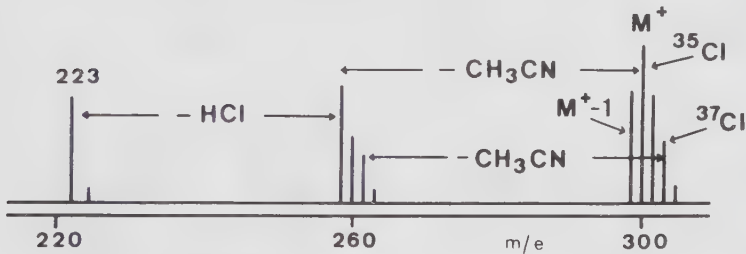


Abb. 10: Fragmentierung chlorhaltiger 1,4-Benzodiazepine im Massenspektrum

Das M⁺-1-Fragment entsteht durch Abspaltung eines Protons aus dem Molekülion am C-3 oder an den aromatischen Ringen. Daraus ergibt sich ein relativ komplexes Molekülionenmuster, das in der Abbildung 10 wiedergegeben ist.

Die Art der enzymatischen Reaktion am 1,4-Benzodiazepingerüst kann in vielen Fällen mit Hilfe der Massenspektroskopie aufgeklärt werden. Bei enzymatischer Demethylierung von N-1-methylierten Verbindungen beobachtet man einen Massenver-

lust von 14 ME gegenüber der Ausgangssubstanz. Hydroxilierungsreaktionen bewirken einen Massenanstieg von 16 ME. Da jedoch enzymatische Hydroxilierungsreaktionen an allen drei Ring-systemen des Benzodiazepingerüsts möglich sind (38, 63, 64), wird die Lokalisierung der eingeführten OH-Gruppe durch Massenspektroskopie erschwert. Eine 3-Hydroxilierung läßt sich im "intakten" Benzodiazepin aufgrund des Schlüsselfragmentes $M^+-(CH_3-CO)$ nachweisen. Findet keine Hydroxilierung in C-3 oder N-4 statt, wird das Schlüsselfragment durch den Verlust von $M^+-(CH_3-CN)$ gebildet (78). Dieselbe Fragmentierung wird durch Hydroxilierung an den Aromaten nicht beeinflußt. Ein intensives Fragment bei M^+-18 ME (H_2O) weist auf para-Hydroxilierung des 5-Phenylringes hin (80).

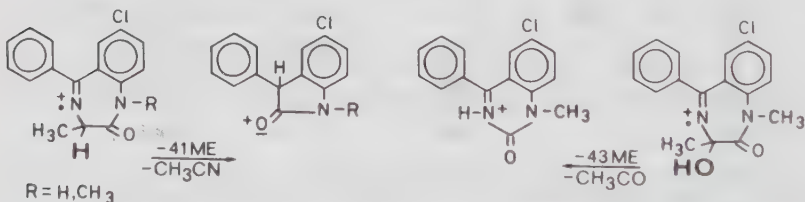


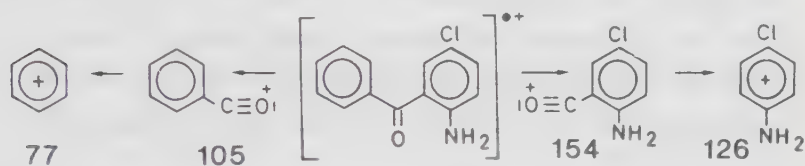
Abb. 11: Schlüsselfragmente des C-3 im Benzodiazepingerüst

Bei N-4-Oxiden ist ein Schlüsselfragment bei M^+-16 ME zu erwarten (79). Eine Verringerung des Molekulargewichts um mehr als 14 Masseneinheiten gegenüber der Ausgangssubstanz deutet auf Umlagerungen des Heterocyclen im Benzodiazepingerüst hin.

2. Fragmentierung der Benzophenone als Hydrolyseprodukte von 1,4-Benzodiazepinen im Massenspektrum

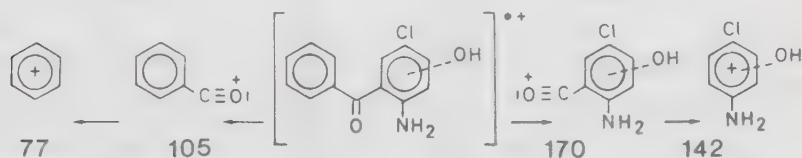
Um die Stellung der eingeführten OH-Gruppe näher zu beschreiben, werden die Benzodiazepin-Metaboliten im Säuren zu Benzophenonen hydrolysiert.

Im Falle einer 3-Hydroxilierung entsteht ein nicht hydroxiliertes Benzophenon, das die folgende Fragmentierung aufweisen muß (81):

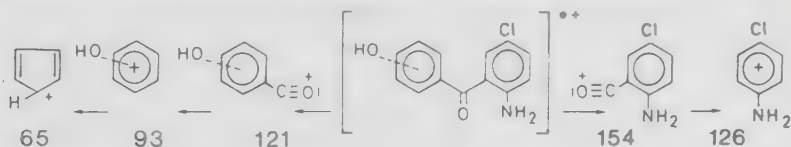


Das gleiche Benzophenon entsteht durch Spaltung von Benzodiazepin-N-4-Oxiden.

Fragmente von m/e 105 und 77 treten auch bei Benzophenonen auf, wenn eine Hydroxilierung in Stellung 9 im Benzodiazepin-gerüst stattgefunden hat.



Durch Hydroxilierung der 1,4-Benzodiazepine am 5-Phenylring werden nach der Hydrolyse Benzophenone mit folgenden Hauptfragmenten erhalten (82):



Die genaue Stellung der eingeführten OH-Gruppe am 5-Phenyl-ring ist auf diese Weise nicht zu bestimmen.

Bei N-Methyl-benzophenonen sind die N-haltigen Fragmente um 14 Masseneinheiten erhöht.

4. Konformation unsymmetrisch substituierter 1,4-Benzodiazepine

Mehrere Arbeiten sind zur Aufklärung der Konformation von 1,4-Benzodiazepinen durchgeführt worden (83-86). Die Methylenprotonen N-1-unsubstituierter 1,4-Benzodiazepin-2-one erscheinen als Singulett, während N-methylierte Derivate ein AB-Spektrum des quasiäquatorialen und des quasiaxialen C-3-Protons durch gehinderte Ringinversionen ergaben (Abb. 12).

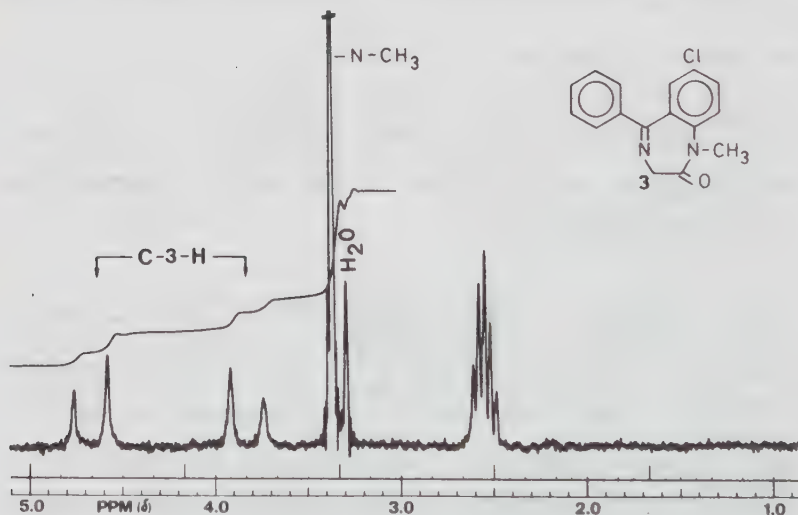


Abb. 12: AB-Spektrum der C-3-Methylenprotonen des Diazepam (IV) in DMSO-d₆ (Registrierbereich 500 Hz)

Diazepam (IV) wird zu 3-Hydroxy-Derivaten metabolisiert (z.B. zu VI und zu XXI) (91). Da weitere Substituenten im Ringgerüst im Allgemeinen die Ringinversion verlangsamen, müßte das tertiäre C-3-Proton von 3-monosubstituierten Derivaten durch eine ausreichende Verweildauer in der quasi-axialen und in der quasiäquatorialen Position im NMR-Spektrum getrennt erfaßbar sein. In den Spektren der in Tabelle 1 aufgeführten 3-monosubstituierten Derivate erschien jedoch jeweils nur ein Singulett für das C-3-H. Diese Beobachtung läßt zwei Schlüsse zu:

- 1) Die Ringinversionsgeschwindigkeit wird durch 3-Substitution beschleunigt, so daß die Signale verschmelzen. Tieftemperaturversuche mit XX und XXI in CDCl_3 bis -55°C führten jedoch zu keiner Änderung des NMR-Spektrums durch Verlangsamung der Ringinversion.
- 2) Es ist nur eine Konformation existent, bzw. eine Konformation überwiegt zu einem erheblichen Teil. Vermutlich wird sich der größere Substituent in der quasiäquatorialen Lage ausrichten.

Weitere Hinweise über die Art der Konformation und über die beteiligten energetischen Prozesse ergeben sich aus den NMR-Spektren von XX in CDCl_3 und DMSO- d_6 (Tabelle 1).

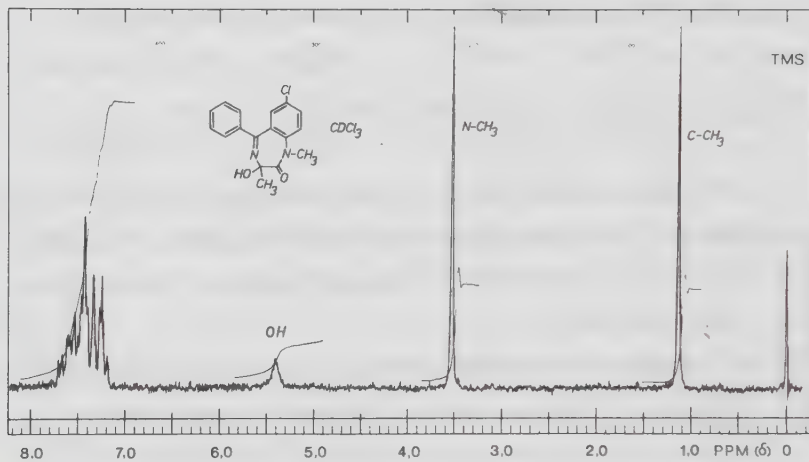


Abb. 13: NMR-Spektrum von XX in CDCl₃ (Registrierbereich 500 Hz)

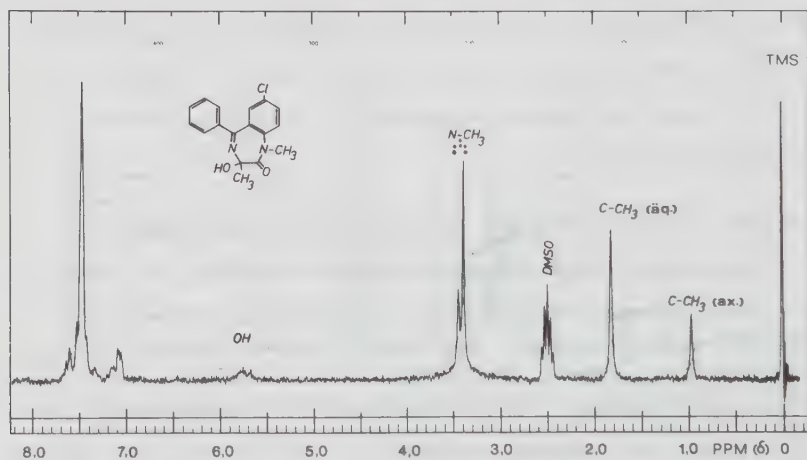


Abb. 14: NMR-Spektrum von XX in DMSO-d₆ (Registrierbereich 500 Hz)

In CDCl_3 kann nur eine Konformation beobachtet werden, und zwar mit einer auffallend hohen Resonanz des $\text{C}-\beta-\text{CH}_3$ bei 1,13 ppm. In $\text{DMSO}-d_6$ jedoch lag XX in zwei Konformationen vor. Das β -Methyl-Signal erschien hier bei 1,82 und 0,98 ppm. Dieses letztere Signal entspricht in der sterischen Anordnung dem Signal bei 1,13 ppm in CDCl_3 , das durch das Lösungsmittel $\text{DMSO}-d_6$ nach höherem Feld verschoben wurde. Vergleichsweise lagen die Resonanzen der monosubstituierten β -Methyl-Derivate X und XI bei 1,46 ppm (X in $\text{DMSO}-d_6$) und bei 1,67 ppm (XI in CDCl_3). Der Unterschied der chemischen Verschiebung zwischen X und XI von 0,21 ppm läßt sich wiederum auf den Lösungsmiteleinfluß zurückführen.



Substanz	R ₁	R ₂ (axial)	R ₃ (äquatorial)	R ₄	Lösungs- mittel
IV	CH ₃ s 3,34	H d 3,80 (11)	H d 4,63 (11)	-	DMSO-d6
XXI	CH ₃ s 3,38	H s 4,86	OH	-	DMSO-d6
VI	H s 10,96	H s 4,80	OH	-	DMSO-d6
XII	CH ₃ s 3,40	H q 3,72 (6,5)	CH ₃ d 1,72 (6,5)	-	CDCl ₃
XIII	H s 10,56	H q 3,70 (6,5)	CH ₃ d 1,54 (6,5)	-	DMSO-d6
XI	CH ₃ s 3,49	H q 4,44 (6,5)	CH ₃ d 1,67 (6,5)	0	CDCl ₃
X	H s 11,06	H q 4,54 (6,5)	CH ₃ d 1,46 (6,5)	0	DMSO-d6
XX	CH ₃ s 3,53	CH ₃ s 1,13	OH	-	CDCl ₃
(30%)	s 3,47	s 0,98			DMSO-d6
(70%)	CH ₃ s 3,39	OH	CH ₃ s 1,82	-	DMSO-d6

Tabelle 1: H-NMR-Signale der Substituenten verschiedener Benzodiazepine (in ppm, J in Hz)

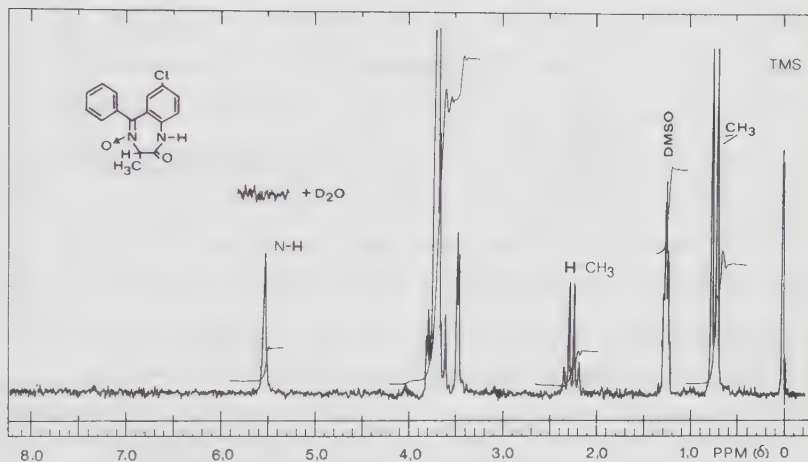


Abb. 15: NMR-Spektrum von X in DMSO-d₆ (Registrierbereich 500 Hz)

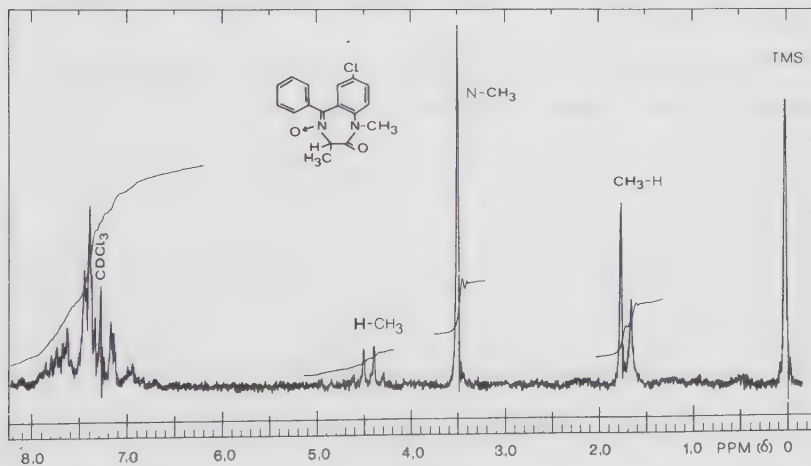


Abb. 16: NMR-Spektrum von XI in CDCl₃ (Registrierbereich 500 Hz)

Es ist bereits gezeigt worden, daß die Resonanz des quasi-axialen Substituenten durch den Ringstrom des gegenüberliegenden, ankondensierten Benzorings erheblich nach höherem Feld verschoben wird (87). Man kann daher das Signal bei höherem Feld der quasi-axialen Lage des Methylsubstituenten zuordnen. In CDCl_3 lag XX zu annähernd 100 % in der Konformation mit quasi-axialem $\text{C}-3-\text{CH}_3$ und in $\text{DMSO}-d_6$ zu 70 % mit quasi-äquatorialem $\text{C}-3-\text{CH}_3$ vor. Diese Anordnung würde etwa der unterschiedlichen Raumauffüllung des OH - und des CH_3 -Substituenten entsprechen, wenn man annimmt, daß sich der größere Substituent äquatorial ausrichtet. Es ist daher zu vermuten, daß sich in unpolarem CDCl_3 , das keine Wasserstoffbrücken bilden kann, der Substituent $\text{C}-3-\text{OH}$ von XX durch intramolekulare Wasserstoffbrücken mit dem Amidcarbonyl in der quasi-äquatorialen Lage stabilisiert. In $\text{DMSO}-d_6$ findet durch intermolekulare Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel eine Umkehrung der Konformation durch sterische Einflüsse statt.

Die $\text{N}-1-\text{CH}_3$ -Signale von XX waren in $\text{DMSO}-d_6$ ebenfalls durch Asymmetrie des Ringes aufgespalten (Tab. 1).

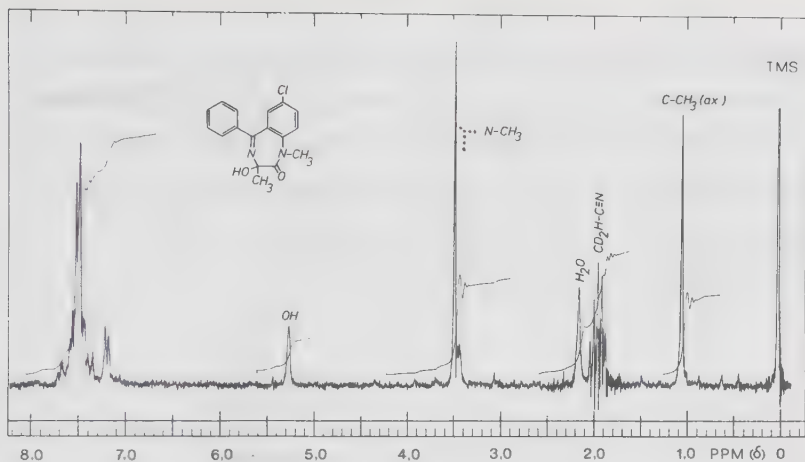


Abb. 17: NMR-Spektrum von XX in CD₂H₂CN (Registrierbereich 500 Hz)

Auch in dem weniger polaren CD₂H₂CN ließ sich am N-1-CH₃-Signal eine Umkehrung der Konformation von etwa 5 % gegenüber CDCl₃ als Lösungsmittel erkennen. Die entsprechende quasiäquatoriale C-3-CH₃ war durch die Resonanzen des nicht deuterierten Lösungsmittels verdeckt.

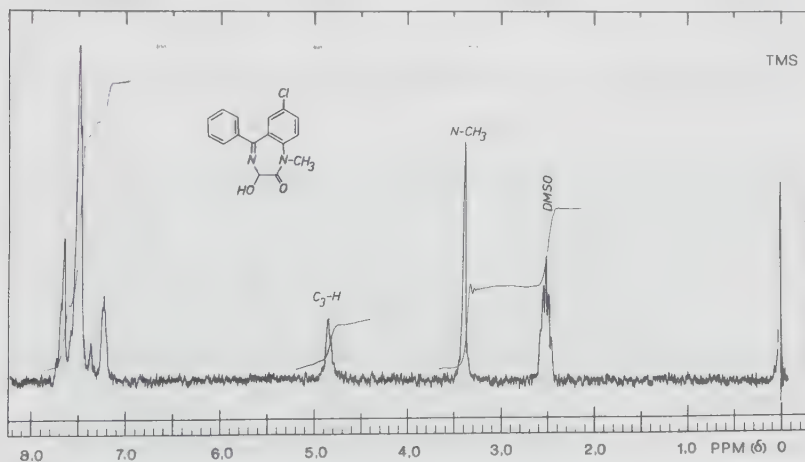


Abb. 18: NMR-Spektrum von XXI in DMSO-d₆ (Registrierbereich 500 Hz)

Das Spektrum von XXI zeigte nur geringfügige Veränderungen in CDCl_3 und DMSO-d_6 , da sowohl intramolekulare Wasserstoffbrücken als auch sterische Effekte des C-3-Substituenten gleichgeschaltet sind. Nach 36-stündigem Trocknen über P_2O_5 bei 70°C spaltete das Singulett des C-3-H zu zwei Dubletts in CDCl_3 und CD_3CN auf (Abb. 19).

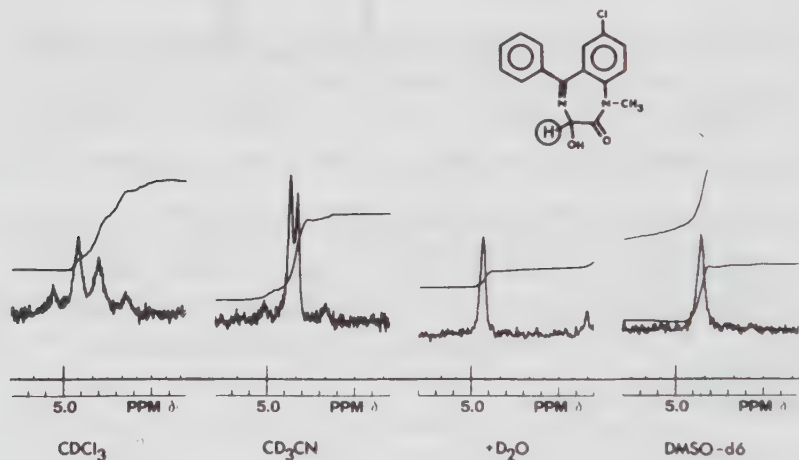


Abb. 19: NMR-Signale des C-3-Protons von XXI (Registrierbereich 500 Hz)

Der Dacheffekt des AB-Spektrums trat besonders deutlich in CD_3CN hervor ($J/\delta = 0,79$). Das AB-Spektrum läßt sich nicht durch eine quasiauxiale und quasiäquatoriale Lage erklären, da das N-CH_3 -Signal nicht aufgespalten wurde und nur eine geringe chemische Verschiebung zwischen den beiden Dubletts vorhanden war (0,1–0,2 ppm, vergl. Abb. 19). Man kann annehmen, daß verschiedene Zustände der Wasserstoffbrückenbindung des OH zum Laktamcarbonyl für die energetischen

Unterschiede verantwortlich sind. In polaren Lösungsmitteln und durch Zusatz von Wasser wird dieser intramolekulare Prozess durch extramolekulare Wasserstoffbrückenbildung beeinflusst. Das entstandene Singulett des quasiäquatorialen C-3-H ließ sich infolgedessen auch nicht bei Tieftemperatur-NMR aufspalten. Die Konformation wurde durch N-4-Oxidierung bei X und XI nicht beeinflusst.

4a Diskussion

Durch unsymmetrische Substitution in 3-Stellung von 1,3-Dihydro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-onen wird die Konformation des 7-Ringes so verändert, daß im NMR-Spektrum nur noch eines der beiden möglichen Konformeren nachgewiesen werden kann. Es ließ sich feststellen, daß sich der größere Substituent aus sterischen Gründen in quasiäquatorialer Lage ausrichtet.

Die pharmakologische Aktivität, die allgemein durch 3-Substitution wie der 3-Methylierung geschwächt wird (51), war bei XX noch geringer als bei den vergleichbaren Derivaten XII und XXI (56).

Es ist bekannt, daß Oxygenierungen durch Konfiguration und Konformation beeinflusst werden können. Die mikrosomale Hydroxylierung des N-Benzoyl-4-methyl-piperidin z.B. fand nur an dem 4-Substituenten in äquatorialer Lage statt (88). Analoge des Diazepam mit quasiäquatorialem 3-Methyl-Substituenten wurden infolgedessen sehr unterschiedlich metabolisiert (siehe Kapitel C).

C Identifizierung der Metaboliten aus Rattenlebermikrosomen-
=====

Inkubationen von Diazepam (IV), 3-Methyl-Diazepam (XII) und
=====

N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII) ~
=====

1. Es wurden zwei verschieden Typen des Metabolismus von
1,4-Benzodiazepinen untersucht: oxidativer Metabolismus
und metabolische Umlagerungen.

Zur Strukturaufklärung der Metaboliten wurden Inkubationen
von 120 Min. mit Rattenlebermikrosomen, die mit Phenobar-
bital induziert waren, herangezogen. Durch die Enzyminduk-
tion entstanden fast alle Metaboliten in höherer Ausbeute.

Inkubationen von Diazepam mit Rattenlebermikrosomen sind
bereits von einigen Autoren beschrieben worden (89-91),
aber mit unterschiedlichen Angaben über die Art und Menge
der entstandenen Metaboliten. Um einen direkten Vergleich
mit den Inkubationen von 3-Methylanalogen des Diazepam zu
ermöglichen, wurde die Inkubation des Diazepam erneut be-
arbeitet und der Metabolismus der mit Äther extrahierbaren
Metaboliten einer eingehenden Untersuchung unterzogen.

I Oxidativer Metabolismus

2. Identifizierung der Metaboliten des Diazepam (IV)

Nach dem Entwickeln der mit Phenobarbital induzierten Inku-
bation von Diazepam in Fl 10 und anschließendem Chromato-
graphieren der um 90° gedrehten Platte in Fl 5 ergab sich
das abgebildete Chromatogramm.

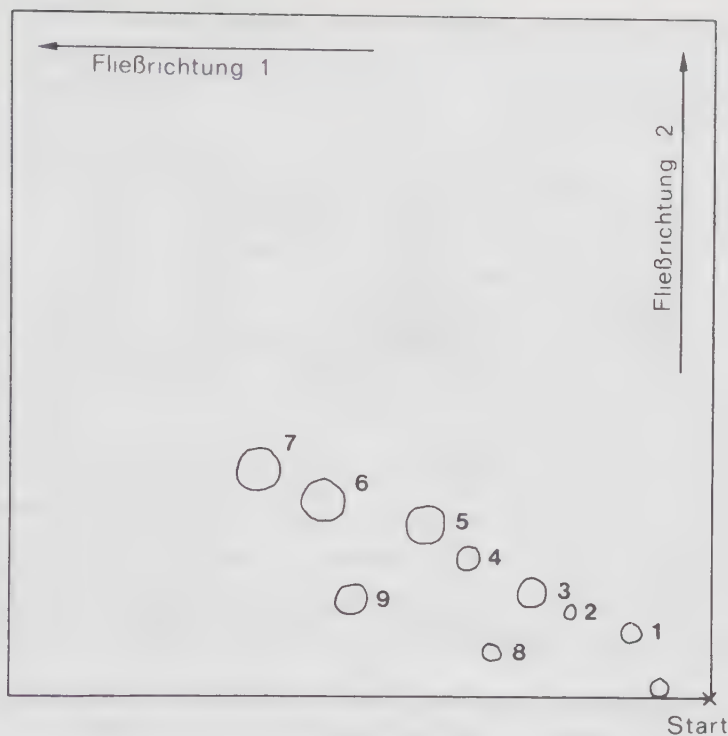


Abb. 20: Zweidimensionales Chromatogramm der mit Phenobarbital induzierten Diazepam-Inkubation

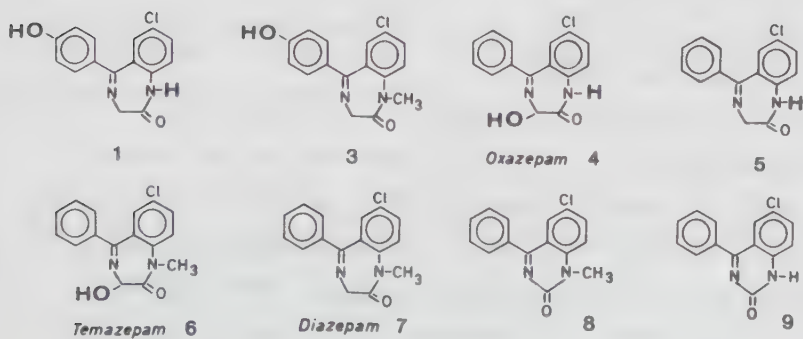


Abb. 21: Schema der identifizierten Diazepam-Metaboliten

Die Metaboliten 1-6 wurden bereits von anderen Autoren beschrieben; 8 und 9 konnten in eigenen Untersuchungen gefunden werden.

Diazepam-Metabolit	Fluoreszenzlösung bei 254 nm	Fluoreszenz bei 360 nm	Bratton-Marshall	Rf-Wert Fl 10	Rf-Wert Fl 5	m/e
9	hellgrün	hellgrün	---	0,63	0,16	270
8	hellgrün	hellgrün	---	0,40	0,02	256
7	+	---	schwach blau	0,68	0,34	284
6	+	---	---	0,58	0,29	300
5	+	schwach grün	rosa	0,41	0,25	270
4	+	---	rosa	0,38	0,21	286
3	+	---	---	0,25	0,17	300
2	+	---	rosa	0,19	0,13	---
1	+	schwach grün	rosa	0,12	0,10	286

Tab. 2: Charakterisierung der Metaboliten aus der Inkubation von Diazepam mit durch Phenobarbital induzierten Mikrosomen

Der Metabolit 3 zeigte bei einer hohen Konzentration auf der DC-Platte am Tageslicht eine Gelbfärbung.

Der Metabolit 2 wurde nur in sehr geringen Mengen gebildet und nicht weiter untersucht.

Die positive Reaktion der Metaboliten 1,2,4 und 5 nach Bratton-Marshall mit vorangegangener Hydrolyse ist charakteristisch für demethylierte Produkte. Die Metaboliten 1,4,6,7 und 9 zeigten in Fl 5 und Fl 10 gleiche Rf-Werte wie die entsprechenden Vergleichssubstanzen (siehe Formelschema). Die Identität dieser Verbindungen wurde weiterhin durch den

Vergleich mit den entsprechenden Massenspektren bewiesen.

Das Massenspektrum des Metaboliten 3 ergab eine Masse von m/e 300 (Abb. 22).

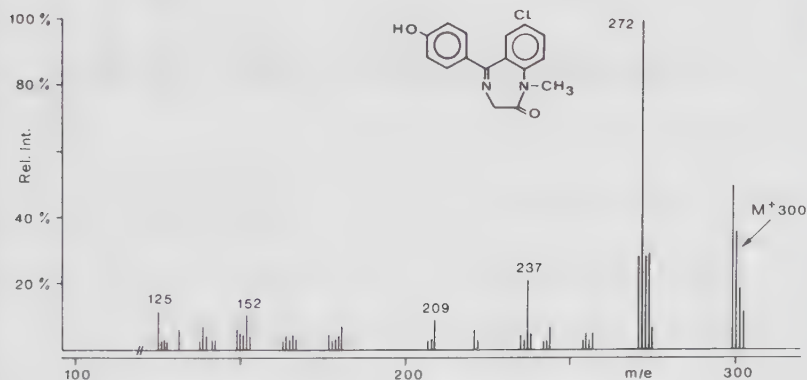


Abb. 22: Massenspektrum des Diazepam-Metaboliten IV₃

Die saure Hydrolyse von Metabolit 3 führte zu einem Benzophenon mit gleichem R_f-Wert wie das Vergleichsmaterial Benzophenon III, besaß eine Masse von 261 und zeigte die typische Fragmentierung hydroxiliierter Benzophenone. Die Hydroxilierung fand hier also in para-Stellung des 5-Phenyl-Substituenten des Diazepam statt.

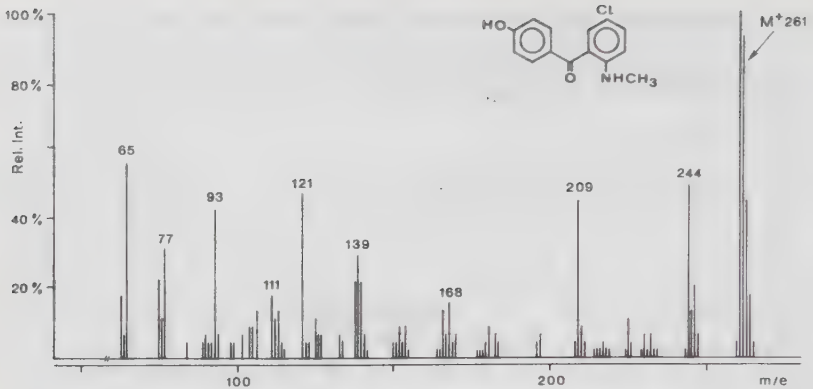


Abb. 23: Benzophenon aus Diazepam-Metabolit IV₃

Das dünnsschichtchromatographische Verhalten des Metaboliten 4 ließ darauf schließen, daß es sich hierbei um Oxazepam handelte. Marcucci und Mitarbeiter (89, 92) dagegen konnten in Inkubationen von Diazepam mit Rattenlebermikrosomen, die mit Phenobarbital induziert waren, kein Oxazepam (Metabolit 4) nachweisen. Das Massenspektrum des Metaboliten 4 ist in der Abb. 24 gezeigt und stimmt mit dem Massenspektrum einer authentischen Probe von Oxazepam (VI) überein.



Abb. 24: Massenspektrum des Diazepam-Metaboliten IV₄

Die Identifizierung der durch Umlagerung entstandenen Metaboliten 8 und 9, die in der Abbildung 21 der Vollständigkeit halber angeführt wurden, wird im Teil C II beschrieben.

3. Identifizierung der Metaboliten des 3-Methyl-Diazepam (XII)

Die Inkubation von 3-Methyl-Diazepam mit Mikrosomen, die durch Phenobarbital induziert waren, ergab nach Entwickeln in Fl 10, Drehen der Platte um 90° und nachfolgendem zweifachem Rechromatographieren in Fl 5 das folgende Chromatogramm:

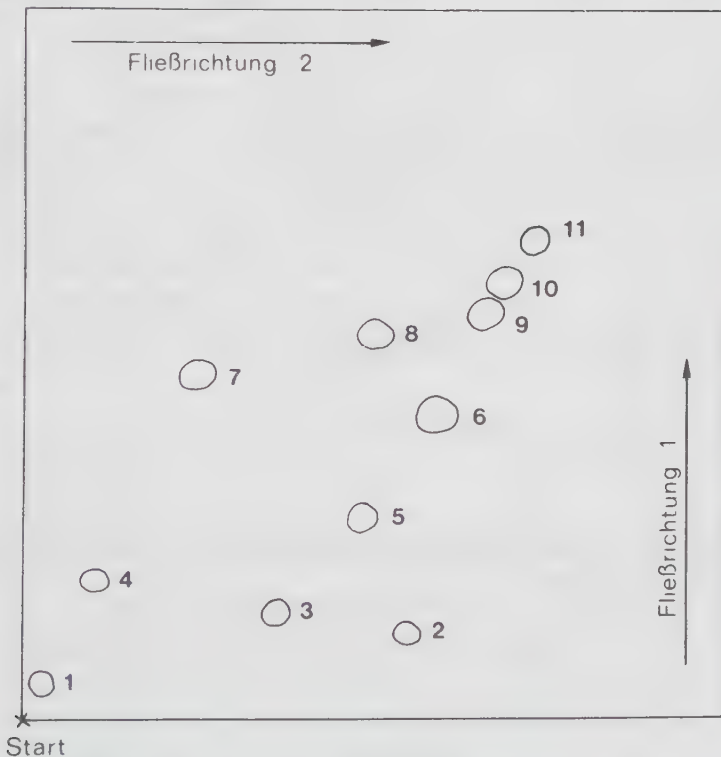
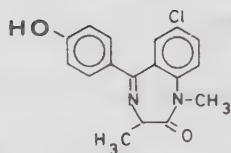
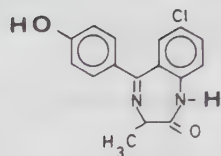


Abb. 25: Zweidimensionales Chromatogramm der mit Phenobarbital induzierten Inkubation von XII

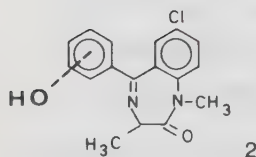
Metaboliten
des
3-Methyl-Diazepam



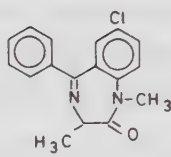
5



3

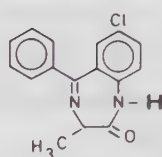


2

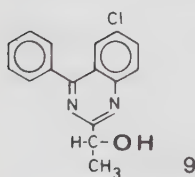


10

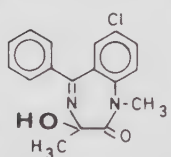
3-CH₃-Diazepam XII



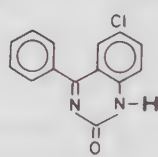
6



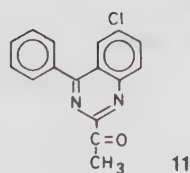
9



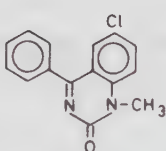
8



4



11



7

Abb. 26: Schema der identifizierten 3-Methyl-Diazepam-Metaboliten

3-CH ₃ - Diazepam- Metabolit	Fluoreszenz- löschung bei 254 nm	Fluoreszenz bei 360 nm	Bratton- Marshall	Rf-Wert Fl 10	Rf-Wert Fl 5	m/e
11	+	---	---	0,65	0,51	282
10	+	---	---	0,59	0,33	298
9	+	blau violett	---	0,56	0,31	284
8	+	---	---	0,52	0,25	314
7	hellgrün	hellgrün	---	0,47	0,12	270
6	+	schwach gelb	rosa	0,42	0,36	284
5	+	---	---	0,28	0,24	314
4	hellgrün	hellgrün	---	0,19	0,05	256
3	+	schwach gelb	rosa	0,15	0,18	300
2	+	---	---	0,13	0,27	314
(1)	+	Nicotinamid aus der Inkubationsmischung				

Tab. 3: Charakterisierung der Metaboliten von 3-Methyl-Diazepam aus der Inkubation von mit Phenobarbital induzierten Mikrosomen

Die Metaboliten 3 und 5 zeigten am Tageslicht eine gelbe Farbe.

Die Metaboliten 3 und 6 ergaben nach Hydrolyse eine positive Reaktion nach Bratton-Marshall und mußten deshalb enzymatisch demethyliert worden sein.

Metabolit 6 besaß den gleichen Rf-Wert wie die Vergleichssubstanz N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII). Der Vergleich der Massenspektren bestätigte die Identität (vergl. Abb. 35).

Das Massenspektrum des Metaboliten 2 ergab eine Masse von m/e 314.

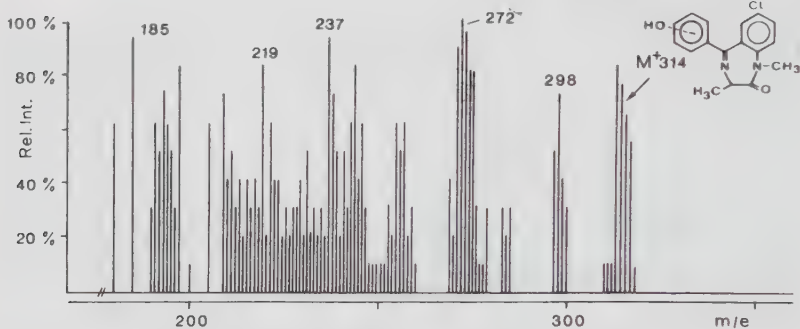


Abb. 27: Massenspektrum des Metaboliten XII₂

Es mußte sich somit um einen hydroxilierten Metaboliten handeln. Da ein isoliertes Fragment hoher Intensität von $M^+ - 43$ ME fehlte, war es wahrscheinlich, daß hier ein phenolischer Metabolit vorlag. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde der Metabolit zum Benzophenon gespalten und von dem entstandenen Spaltprodukt ein Massenspektrum angefertigt.

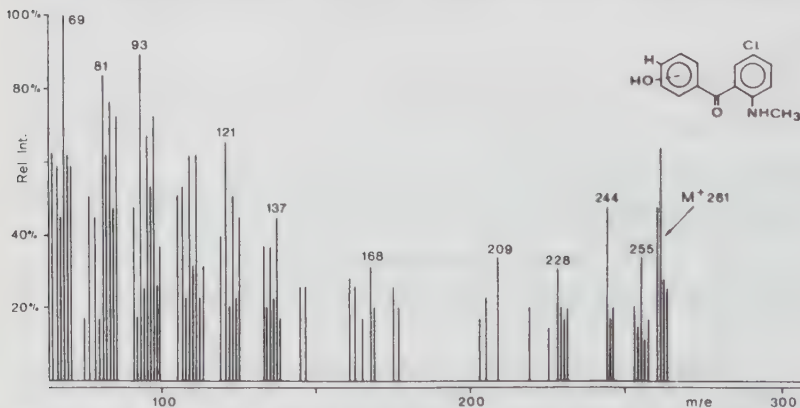


Abb. 28: Massenspektrum des Benzophenons aus Metabolit XII₂

Die Masse des Benzophenons von m/e 261 zeigte, daß die enzymatische Hydroxilierung an den aromatischen Systemen stattgefunden hatte. Die Fragmente hoher Intensität von 93 und 121 ME ließen darauf schließen, daß der Metabolit am 5-Phenylring hydroxiliert worden war.

Im dünnschichtchromatographischen Vergleich mit dem $para$ -OH-N-1-CH₃-Benzophenon III ($R_f = 0,2$) in Fl 17 ergab das Benzophenon aus Metabolit XII₂ einen R_f -Wert von 0,26.

Aus diesen Ergebnissen war zu schließen, daß die Benzophenone nicht identisch waren und die Hydroxilierung in einer anderen Position des 5-Phenylringes als in $para$ -Stellung eingetreten war.

Der Metabolit 3 ergab ein Massenspektrum mit einem Molekulargewicht von m/e 300. Da die Ausgangssubstanz eine Masse von m/e 298 zeigt, mußten Demethylierung und Hydroxilierung zu dem Metaboliten geführt haben. Die Hydrolyse des Metaboliten 3 führte zu einem Benzophenon, das sich in allen verwendeten Fließmitteln mit dem Benzophenon IV gleichartig verhielt und eine Masse von m/e 247 besaß.

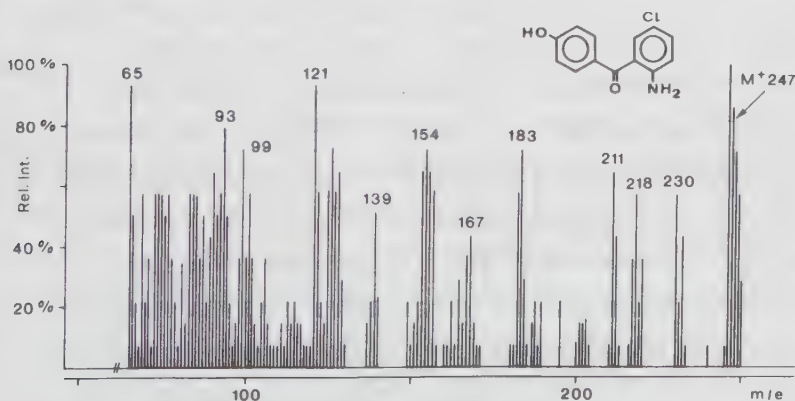


Abb. 29: Massenspektrum des Benzophenons aus Metabolit XII₃

Ein NMR-Spektrum des Metaboliten 3 zeigte eine charakteristische Aufspaltung der aromatischen Protonen.

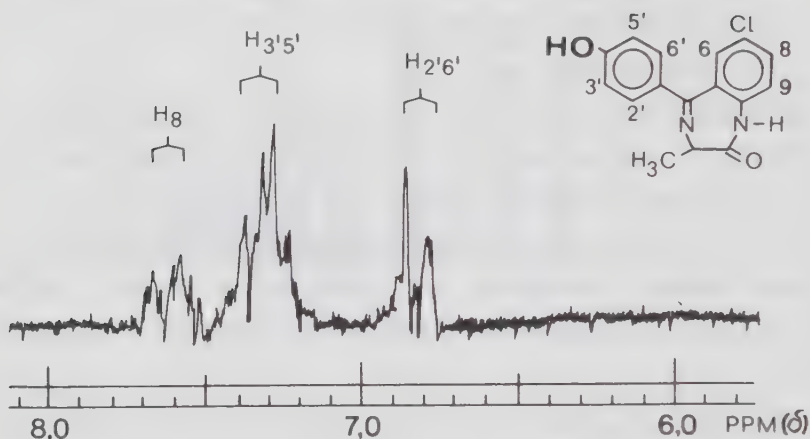


Abb. 30: 100 MHz-Spektrum des Metaboliten XII₃, Aromatenbereich

Der aromatische Bereich des Metaboliten 3 zeigte ein AA'BB'-Aufspaltungsmuster, wobei das Dublett bei $\delta = 7,32$ den Protonen H₃,H₅,, das Dublett bei $\delta = 6,82$ den Protonen H₂,H₆, zugeordnet werden kann. Die Hydroxilierung findet hier also in para-Stellung des 5-Phenylringes statt. Das Signal bei $\delta = 7,62$ zeigte neben einer ortho-Kopplung von 9 Hz eine weitere Aufspaltung von ca. 2 Hz, die für ein meta-ständiges Proton charakteristisch ist. Daraus folgte, daß dieses Signal dem Proton H₈ zuzuordnen war. Die Signale der Protonen H₆ und H₉ erschienen bei $\delta = 7,1 - 7,4$ als ein Multiplett, das teilweise die Protonen H₃,H₅, verdeckte und eine genaue Zuordnung nicht erlaubte. Die Signale erschienen bei gleichem Feld wie bei der Substanz XXII, die einen analogen

4'-hydroxilierten Metaboliten darstellt.

Das Massenspektrum des durch Hydrolyse erhaltenen Benzophenon des Metaboliten 2 wies eine ähnliche Fragmentierung wie das aus Metabolit 5 erhaltene 4'-Hydroxi-N-methyl-benzophenon III auf. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß die Hydroxilierung des Benzodiazepins XII in zwei verschiedenen Positionen des 5-Phenylringes stattgefunden hatte.

Vom Metaboliten 5 wurde ein Massenspektrum angefertigt.

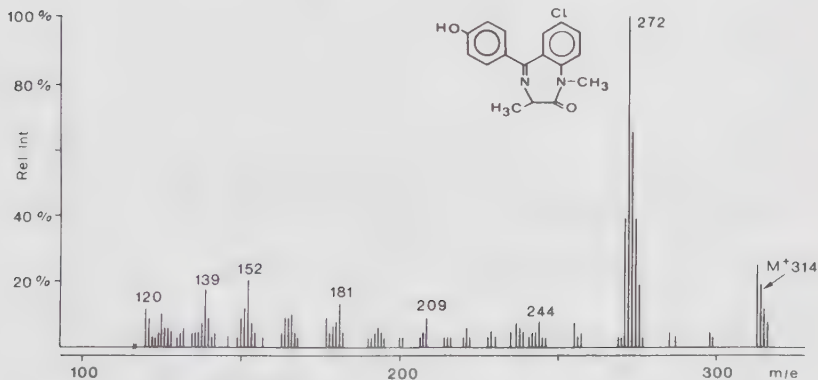


Abb. 31: Massenspektrum des Metaboliten XII₅

Die Masse von m/e 314 zeigte, daß ein hydroxilierten Metabolit vorlag. Zur Lokalisierung der eingeführten OH-Gruppe beim Metaboliten 5 wurde ein NMR-Spektrum angefertigt. Die aromatischen Protonen zeigten eine gleiche Aufspaltung wie beim Metaboliten 3, so daß der Metabolit 5 als 4'-OH-3-Methyl-Diazepam identifiziert werden konnte. Das Massenspektrum des durch Hydrolyse erhaltenen Benzophenons wies

die in Abbildung 23 wiedergegebenen Fragmente auf. Metabolit 8 verhielt sich dünnschichtchromatographisch wie die Vergleichssubstanz XX. Die von beiden Substanzen angefertigten Massenspektren waren identisch und zeigten die charakteristische Fragmentierung von $M^+ - 43$ ME, die eine 3-Hydroxilierung voraussetzte.

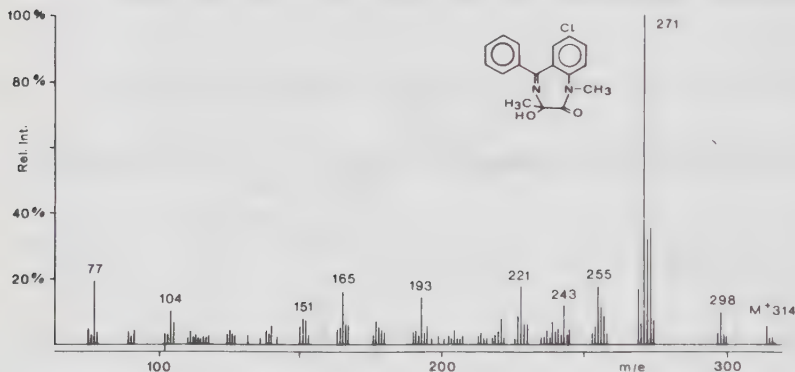


Abb. 32: Massenspektrum des Metaboliten XII₈

Die Metaboliten 3, 7, 9 und 11 konnten aufgrund ihrer unterschiedlichen UV-Spektren und ihrer Fluoreszenz als Umlagerungsprodukte der Benzodiazepine identifiziert werden. Diese durch Ringverengung entstandenen Metaboliten werden in Kapitel C II diskutiert.

3. Identifizierung der Metaboliten des N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII)

Am Beispiel des N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII) sollte weiterhin der Einfluß des Substitutionsmusters auf den Metabolismus untersucht werden. Da XIII gleichzeitig einen Meta-

boliten des 3-Methyl-Diazepam (XII) darstellt, sollte untersucht werden, welche Abbauprodukte von XII über dessen demethylierten Metaboliten XIII gebildet wurden. Durch direkte Inkubation von XIII war es zusätzlich möglich, bestimmte Metaboliten in größerer Ausbeute herzustellen.

Bei der Inkubation von XIII mit durch Phenobarbital induzierten Mikrosomen ergab sich nach dem zweidimensionalen Entwickeln in Fl 10 und anschließend in Fl 5 das folgende Chromatogramm:

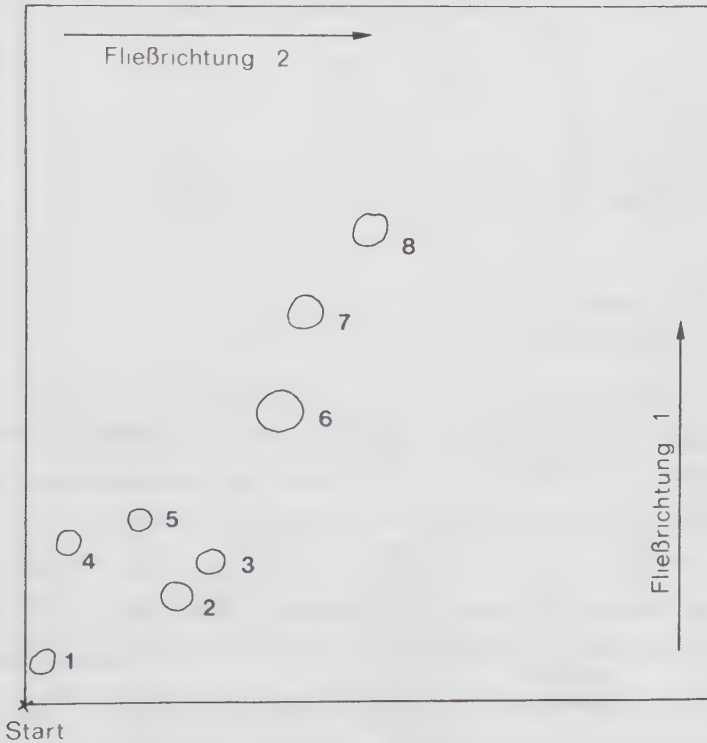
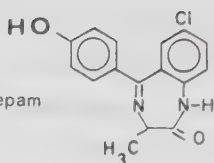


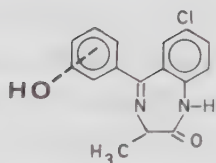
Abb. 33: Chromatogramm der mit Phenobarbital induzierten Inkubation von XIII

Metaboliten
des

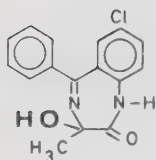
N-1-Nor-3-Methyl-Diazepam



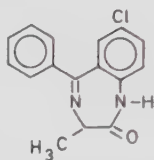
2



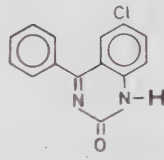
3



5

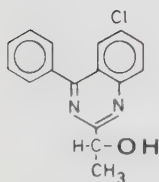


6

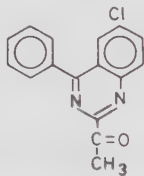


4

N-1-Nor-3-CH₃-Diazepam XIII



7



8

Abb. 34: Schema der identifizierten N-1-Nor-3-methyl-Diazepam-Metaboliten

Inkub. XIII	Fluoreszenz- Metabolit	Fluoreszenz- löschung bei 254 nm	Fluoreszenz bei 360 nm	Bratton- Marshall	Rf-Wert Fl 10	Rf-Wert Fl 5	m/e
8	+	---	---	0,67	0,51	282	
7	+	blau	---	0,55	0,42	284	
6	+	schwach gelb	+	0,41	0,39	284	
5	+	schwach gelb	+	0,27	0,18	300	
4	schwach grün	hellgrün	---	0,24	0,07	256	
3	+	schwach gelb	+	0,20	0,27	300	
2	+	schwach gelb	+	0,15	0,22	300	
(1)	+	Nicotinamid aus der Inkubationsmischung					

Tab. 4: Charakterisierung der Metaboliten aus der Inkubation von N-1-Nor-3-methyl-Diazepam mit mit Phenobarbital induzierten Mikrosomen

Im dünn-schichtchromatographischen Vergleich verhielt sich der Metabolit 6 wie die Ausgangssubstanz XIII. Nach dem Rechromatographieren der entsprechenden Bande in Fl 5 und anschließender dünn-schichtchromatographischer Reinigung der Substanz wurde ein mit der Ausgangssubstanz identisches Massenspektrum erhalten.

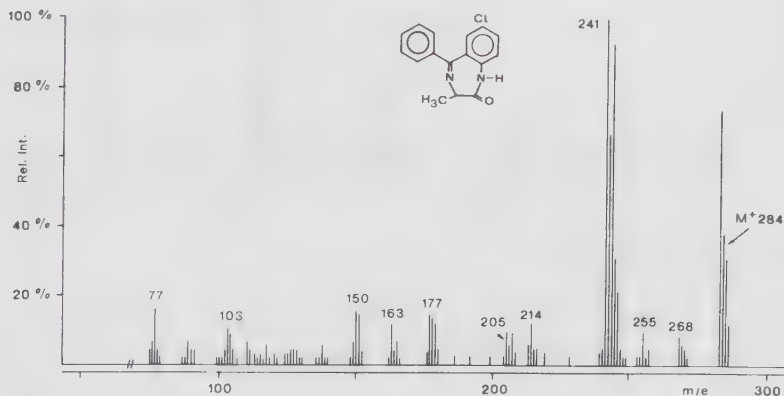


Abb. 35: Massenspektrum des Metaboliten XIII₆

Das gleichzeitige Chromatographieren der Inkubationen XII und XIII auf derselben DC-Platte gab weitere Hinweise durch Übereinstimmung von R_f-Werten auf eine eventuelle Identität der entsprechenden Substanzflecken in beiden Inkubationen. Bei diesem Vergleich zeigten die Metaboliten XIII_{2,4,7,8} gleiche R_f-Werte wie die Metaboliten XII_{3,4,9,11}. Einen weiteren Hinweis auf Übereinstimmung gaben die gleichen Fluoreszenzen der Metaboliten XII₄ und XIII₄ und der Metaboliten XII₉ und XIII₇.

Der Metabolit XIII₂ ergab das gleiche Massenspektrum wie der Metabolit XII₃.

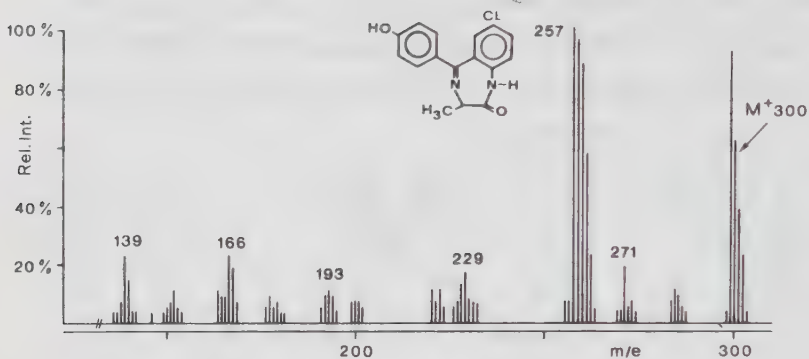


Abb. 36: Massenspektrum des Metaboliten XIII₂

Die saure Hydrolyse führte in beiden Fällen zum gleichen para-hydroxilierten Benzophenon IV (vergl. Abb. 29). Diese Tatsachen und die Übereinstimmung der R_f-Werte bestätigen die angenommene Identität beider Metaboliten.

Die folgende Abbildung 37 zeigt das Massenspektrum des Metaboliten XIII₃.

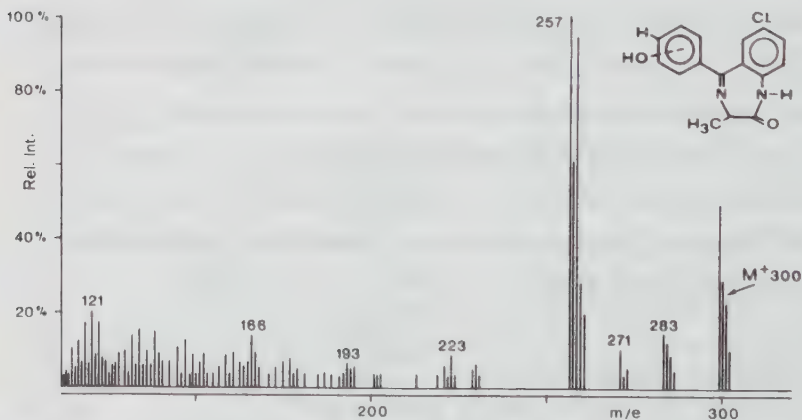


Abb. 37: Massenspektrum des Metaboliten XIII₃

Die Masse von m/e 300 deutete auf einen hydroxilierten Metaboliten hin. Die Intensität der Fragmente von m/e 257, 258, 259, 260 zeigte, daß es sich hier um kein 3-hydroxiliertes Produkt handeln konnte.

Die saure Hydrolyse des Metaboliten 3 führte zu einem Benzophenon, das mit dem 4'-Hydroxi-benzophenon IV und dem 3-Hydroxi-benzophenon V in Fl 17 verglichen wurde. Die R_f -Werte des Benzophenons aus Metabolit 3 ($R_f = 0,16$) waren von denen des Benzophenons IV ($R_f = 0,14$) wenig verschieden. Das Benzophenon V besaß einen R_f -Wert von 0,24. Um eine mögliche Identität der Benzophenone zu prüfen, wurden sie auf der DC-Platte der Reaktion nach Bratton-Marshall unterzogen. Das Benzophenon aus Metabolit XIII₃ und das Benzophenon V zeigten bei Einwirken der nitrosen Gase eine braune Farbe, das Benzophenon IV dagegen eine Gelbfärbung. Nach dem Besprühen mit dem Kupplungsreagenz wurde das Benzophenon V braun, das Benzophenon IV und das Benzophenon aus Metabolit 3 wurden rosa.

Nach diesen Untersuchungen war eine 9-Hydroxilierung im Benzodiazepingerüst auszuschließen. Da kein Benzophenon II nachzuweisen war, mußte die Hydroxilierung am 5-Phenylring des Benzodiazepins stattgefunden haben. Die para-Stellung war auszuschließen, da bereits Metabolit XIII₂ in dieser Position hydroxiliert worden war. Diese Ergebnisse ließen nur noch die in Abbildung 37 wiedergegebene Struktur zu.

Im Vergleich zu anderen Metaboliten der Inkubation von XIII ergab der Metabolit 5 eine relativ starke Reaktion nach Bratton-Marshall (mit vorangegangener Hydrolyse). Diese

Tatsache deutete auf einen relativ säurelabilen Metaboliten hin. Das Massenspektrum zeigte eine Masse von m/e 300.

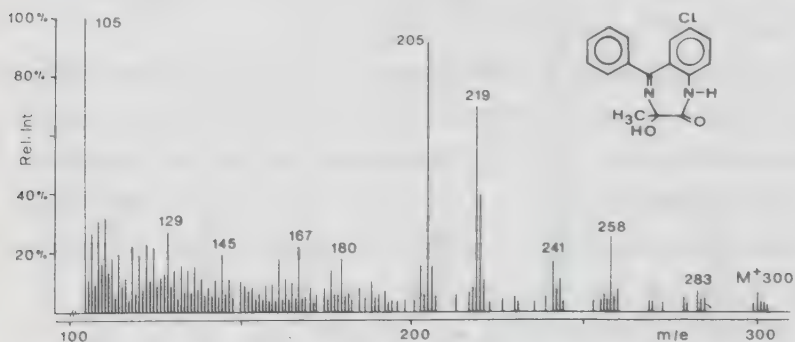


Abb. 38: Massenspektrum des Metaboliten XIII₅

Das Fragment hoher Intensität von $M^+ - 42$ ME war ungewöhnlich und gab keine Information über die Stellung der enzymatisch eingeführten OH-Funktion. Um zu weiteren Informationen zu gelangen, wurde der Metabolit 5 im Sauren hydrolysiert und das entstandene Benzophenon mit den Benzophenonen II, IV und V in Fl 17 verglichen. Der Rf-Wert (0,45) des Hydrolyseproduktes war mit dem des Benzophenons II identisch. Nach der Isolierung und Aufreinigung des Benzophenons aus Metabolit 5 konnte ein mit dem Benzophenon II identisches Massenspektrum erhalten werden.

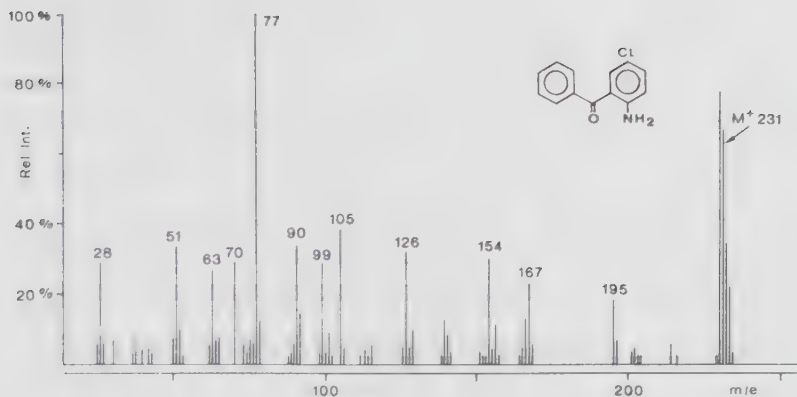


Abb. 39: Massenspektrum des Benzophenons aus Metabolit XIII₅

Die Masse des Benzophenons von m/e 231 schloß eine Hydroxilierung an den Aromaten aus. Der Vergleich des Massenspektrums des Metaboliten 5 mit dem synthetisierten N-4-Oxid X fiel negativ aus. Somit war nur noch eine Hydroxilierung in Stellung 3 des Diazepinringes möglich.

Die ungewöhnliche Fragmentierung des Metaboliten im Massenspektrum wäre durch eine vorangegangene Umlagerung des sehr instabilen 3-OH-N-1-Nor-Produktes erklärbar. Diese Ergebnisse lassen die in Abbildung 39 wiedergegebene Konstitutionsformel am wahrscheinlichsten werden.

5. Diskussion

Die Hauptmetaboliten der Diazepam-Inkubation waren Desmethyl-diazepam (V) und 3-OH-Diazepam (XXI). Eine Hydroxilierung an den Aromaten konnte nur in para-Stellung des 5-Phenylringes nachgewiesen werden. Phenolische Metaboliten bildeten

nur einen geringen Anteil am Gesamtmetabolismus des Diazepam (IV). Beim Heterocyclen traten Ringverengungen nur zu Chinazolinonen auf.

Durch die Einführung der 3-Methylgruppe beim Diazepam(XII) in quasiäquatorialer Lage wurde die Hydroxilierung in dieser Position zurückgedrängt. Es entstand außer dem para-hydroxilierten Metaboliten ein phenolischer Metabolit, der eine Hydroxilierung in einer anderen Position des 5-Phenylringes aufwies. Im Vergleich zum Diazepam (IV) wurde der Anteil phenolischer Metaboliten merklich erhöht. Bei den Inkubationen des N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII), das am N-1 nicht mehr weiter metabolisiert werden kann, bildete der phenolische 4'-Hydroxi-Metabolit den Hauptanteil. Die 3-Methylgruppe führte zu einem Stabilitätsverlust des Heterocyclen, so daß Chinazolinone in größerer Ausbeute entstanden. Zusätzlich ließen sich bei den 3-Methylanalogen des Diazepam (XII und XIII) die Chinazolin-Derivate XV und XIII₇ nachweisen.

Es ist bemerkenswert, daß keine enzymatische Veränderung der 3-Methylgruppe nachgewiesen werden konnte, obgleich die Funktion durch die sterische Anordnung an der Enzymoberfläche exponiert sein müßte. Es ist daher naheliegend, daß die C-H-Bindung in Methylgruppen langsamer als eine C-H-Bindung am aromatischen Kern oxygeniert wird. Die C-3-H-Bindung ist dagegen durch die benachbarte CO-Funktion und die Imino-Funktion stark aktiviert. Diese Stellung ist jedoch sterisch durch die quasiäquatoriale Methylgruppe behindert.

N-4-Oxide als mögliche Zwischenstufe der 3-Hydroxilierung (90, 93) ließen sich auch bei den Inkubationen der 3-Methyl-

benzodiazepine XII und XIII in keinem Fall nachweisen. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß durch die Anordnung von Methylgruppen im 1,4-Benzodiazepinring die Oxygenierungsschritte der Benzodiazepine gezielt beeinflusst werden können.

Zu den folgenden Untersuchungen wurden die drei Derivate Diazepam (IV), 3-Methyl-Diazepam (XII) und N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII) verwendet, um den Einfluß von sterischer Anordnung, Enzyminduktion und -inhibierung auf die metabolische Oxygenierung nachzuweisen.

C II Metabolische Umlagerungen von 1,4-Benzodiazepinen durch ===== Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen =====

1. Da bei den Inkubationen von Diazepam (IV) und seiner 3-Methyl-Analogen (XII und XIII) stark grün fluoreszierende Metaboliten entstanden waren, die von 1,4-Benzodiazepinen verschiedene UV-Spektren zeigten, lag die Vermutung nahe, daß eine enzymatische Umlagerung der Benzodiazepine stattgefunden hatte. Wir konnten die Strukturen der umgelagerten Metaboliten aufklären.

Unabhängig von unseren Untersuchungen wurden Metaboliten mit Chinazolinon-Strukturen in der Literatur beschrieben. Beim Metabolismus des Medazepam (XIV) und des Lorazepam (XXX) im Menschen fanden Rieder und Mitarbeiter (22) und Schillings und Mitarbeiter (77) eine Ringverengung des Diazepin-Gerüsts. In Ratten wird Oxazepam (VI) ebenfalls zu einem "ringverengten" Metaboliten umgelagert (76). Das folgende Schema zeigt die beobachteten metabolischen Umlagerungen.

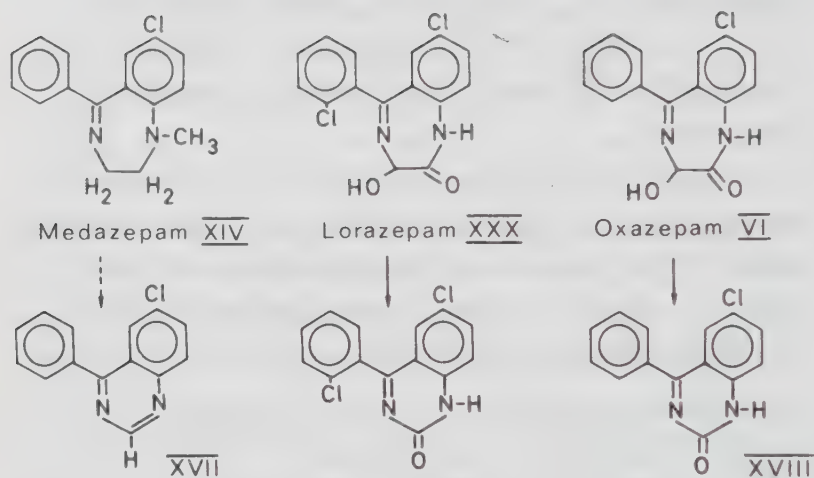


Abb. 40: Bekannte Umlagerungsreaktionen von 7,4-Benzodiazepinen

Da in diesen Arbeiten aber nur die Struktur der umgelagerten Metaboliten aufgeklärt wurde, deren Vorstufen und Mechanismus der Bildung aber nicht geklärt wurden, war es von Interesse, den enzymatischen Mechanismus der Ringverengung genauer zu untersuchen. Die 3-Methylanalogen des Diazepam (XII und XIII), bei denen eine Oxidation zu 3-Oxo-Verbindungen ausgeschlossen war, sollten den Mechanismus aufklären helfen.

2. Strukturaufklärung der umgelagerten Metaboliten von Diazepam (IV), 3-Methyl-Diazepam (XII) und N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII)

Das Massenspektrum des Metaboliten XII₇ ergab eine Masse von m/e 270.

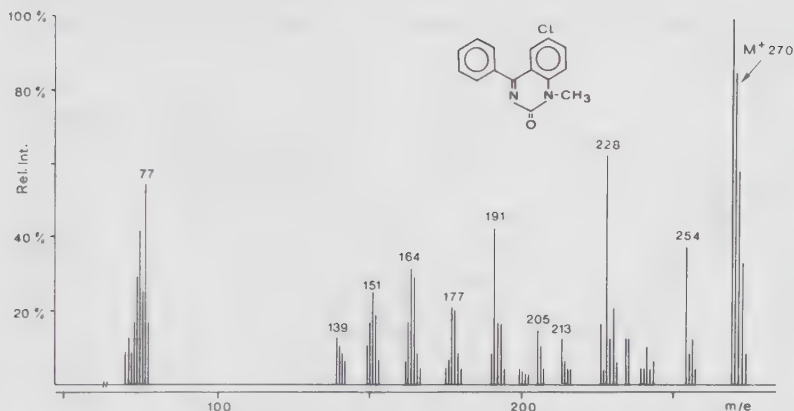


Abb. 41: Massenspektrum des Metaboliten XII₇

Die starke Fluoreszenz des Metaboliten deutete auf eine Ringverengung des Heterocyclen hin. Der Analogschluß zum Lorazepam-Metabolismus (77) führte zur Synthese des 1-Methyl-chinazolinons (XIX), dessen analytische Daten mit denen des Metaboliten XII₇ übereinstimmten. Die Substanzen zeigten die gleichen UV-Spektren und Fluoreszenzanregungs- und Emissionsstrahlungsmaxima.

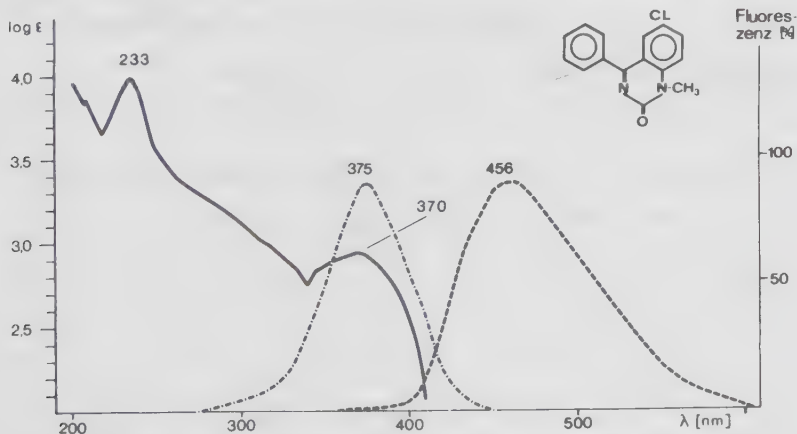


Abb. 42: Spektrofotometrische Daten des Metaboliten XII₇
 — UV, - - - Anregung, --- Emission

Der dünnschichtchromatographische und spektrofluorometrische Vergleich des Metaboliten XII₄ mit dem synthetisierten N-1-H-Chinazolinon (XVIII) bewies die Identität der beiden Verbindungen.

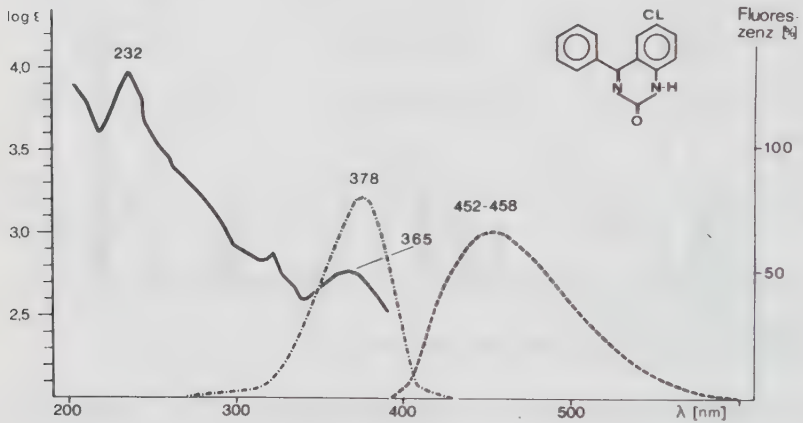


Abb. 43: Spektrofotometrische Daten des Metaboliten XII₄
— UV, - - - Anregung, --- Emission

Der Metabolit XIII₇ verhielt sich dünnschichtchromatographisch wie der Chinazolin-Metabolit XVII aus dem Stoffwechsel des Medazepam (XIV) (22). Daher wurden von beiden Substanzen die UV-, Anregungs- und Emissionsstrahlungsmaxima gemessen und in Abbildung 44 und 45 verglichen.

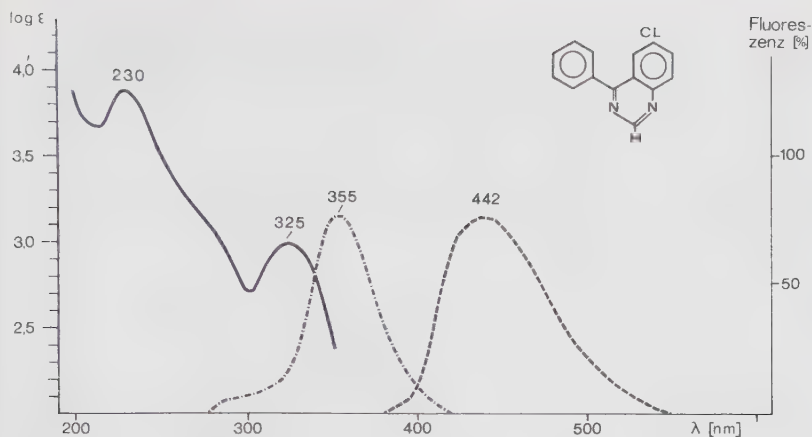


Abb. 44: Spektrofotometrische Daten des Metaboliten XVII aus dem Stoffwechsel des Medazepam
 — UV, - . - Anregung, - - - Emission

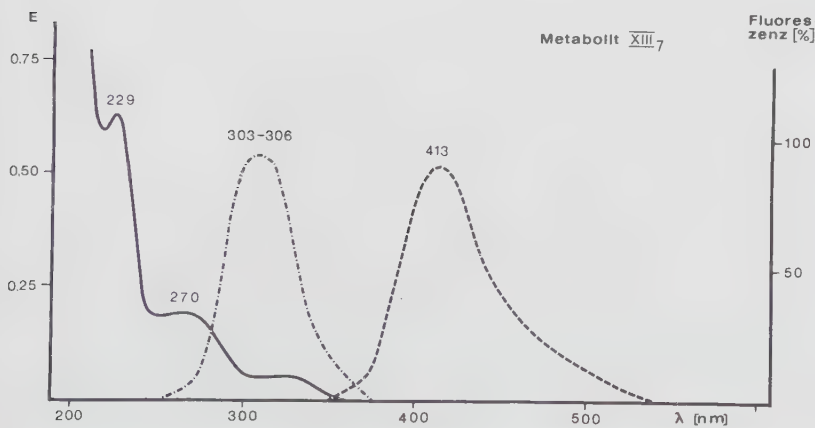


Abb. 45: Spektrofotometrische Daten des Metaboliten XIII₇
 — UV, - . - Anregung, - - - Emission

Die weit auseinander liegenden Anregungs- und Emissionsstrahlungsmaxima sprachen gegen eine Strukturähnlichkeit des Metaboliten XIII₇ mit der Substanz XVII.

Ein Massenspektrum des Metaboliten XIII₇ deutete auf ein Molekulargewicht von 284 hin.

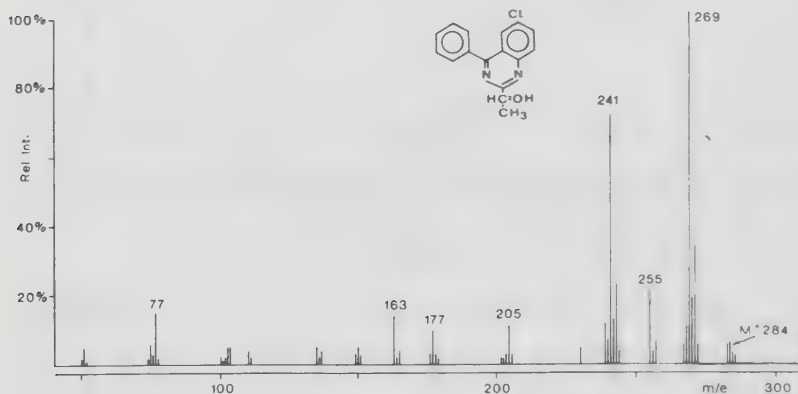


Abb. 46: Massenspektrum des Metaboliten XIII₇

Der Metabolit XIII₇ besaß damit die gleiche Masse wie die Ausgangssubstanz XIII. Die blaue Fluoreszenz bei 360 nm auf der DC-Platte deutete auf eine Ringverengung des Heterocyclen zu einem Chinazolin-Derivat hin. Die Interpretation des Massenspektrums des "intakten" Metaboliten XIII₇ ließ keine exakte Bestimmung der Struktur des Metaboliten zu. Um zu weiteren Informationen zu gelangen, wurde ein NMR-Spektrum angefertigt.

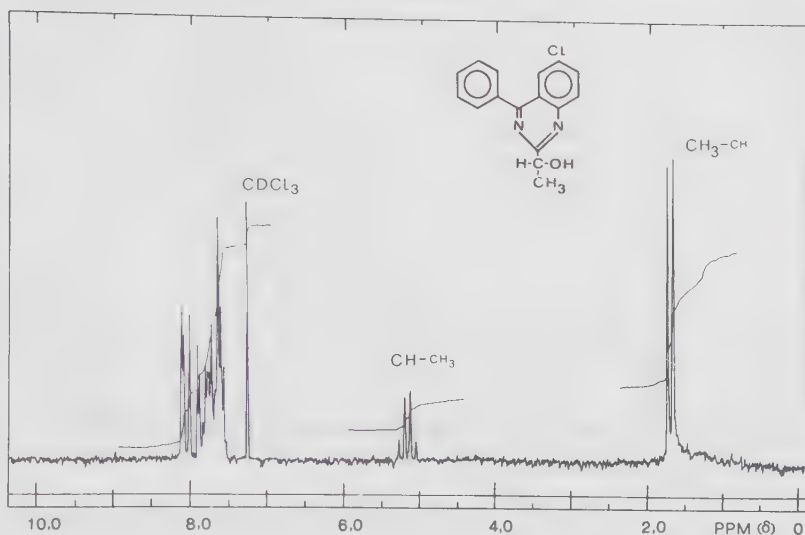


Abb. 47: 90 MHz-Spektrum des Metaboliten XIII₇

Die starke chemische Verschiebung der aromatischen Protonen nach niedrigerem Feld (7,6-8,1 ppm) gegenüber den Signalen aromatischer Protonen von 1,4-Benzodiazepinen, die gewöhnlich im Bereich von 7,2 - 7,7 ppm erscheinen, sprach ebenfalls für eine Chinazolin-Struktur. Dagegen war das Methyl-Dublett gegenüber Signalen von β -CH₂- β -H-Protonen aus Benzodiazepinen nur wenig verschoben. Das Signal der β -C-H-Gruppe war jedoch um ca. 1,3 ppm stark nach niedrigerem Feld verschoben. Diese Daten ließen die in Abb. 47 gezeigte Struktur als wahrscheinlich gelten.

Zur Bestätigung der aus dem NMR-Spektrum abgeleiteten Struktur mit einer OH-Funktion wurde der Metabolit XIII₇ mit

Pentafluorpropionsäureanhydrid in das Pentafluorpropionat überführt und nochmals ein Massenspektrum angefertigt.

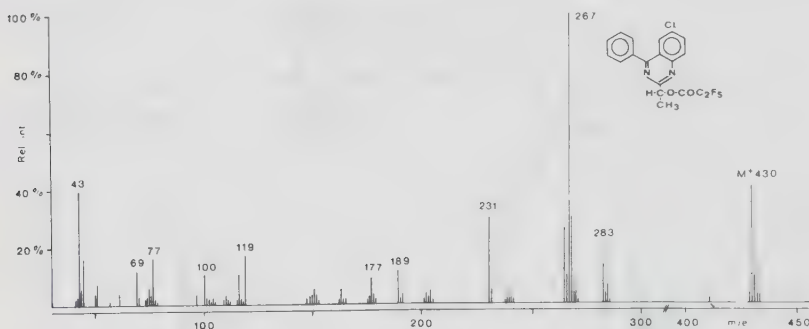


Abb. 48: Massenspektrum des Pentafluorpropionsäureesters des Metaboliten XIII₇

Die durch die Veresterung erhöhte Masse des Metaboliten auf 430 verlor $\text{COC}_2\text{F}_5 = 147$ ME und $\text{OCOC}_2\text{F}_5 = 163$ ME. Damit ist die in Abbildung 46 wiedergegebene Struktur bewiesen.

Die ungewöhnliche Fragmentierung des Metaboliten XIII₇ von $\text{M}^+ - \text{CH}_3$ und $\text{M}^+ - \text{CO}$ wäre durch Aufnahme von zwei Protonen durch das aromatische System des Heterocyclen erklärbar. Ähnliche Systeme wie ein 1-Benzyl-1-hydroxiäthan verlieren durch den gleichen Mechanismus CH_2 und CO .

Vom Metaboliten XIII_g wurde ein Massenspektrum angefertigt.



Abb. 49: Massenspektrum des Metaboliten XIII_g

Der Verlust von 2 ME gegenüber der Ausgangssubstanz XIII und das Fehlen eines $M^+ - 41 = \text{CH}_3\text{CN}$ -Fragments, das für 3-Methyl-3-H-1,4-Benzodiazepin-2-one charakteristisch ist, schlossen eine Benzodiazepin-Struktur aus. Die Fragmente $M^+ - 42$ und $M^+ - 43$ wurden als Verlust von $\text{CH}_2=\text{CO}$ und CH_3CO interpretiert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die in Abb. 43 wiedergegebene Konstitutionsformel am wahrscheinlichsten.

Zur Strukturbestätigung des Metaboliten XIII_g wurde die Substanz XV synthetisiert. Das dünnschichtchromatographische Verhalten und die IR-Spektren des Metaboliten XIII_g und der synthetisierten Verbindung XV stimmten überein. Somit handelte es sich bei dem Metaboliten XIII_g um das 2-Acetylchinazolin-Derivat XV.

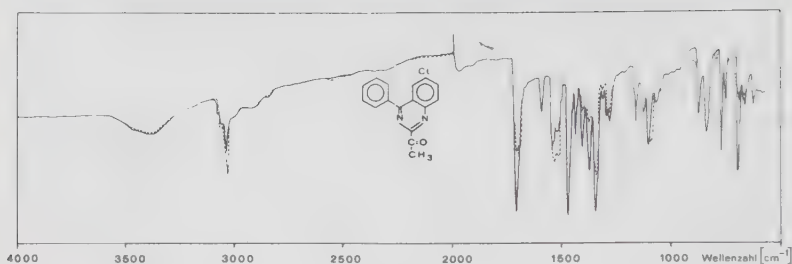


Abb. 49: IR-Spektren des synthetisierten Produktes XV ———, und des Metaboliten XIII₈ -----

Das 2-Acethylchinazolin XV und der analoge reduzierte Metabolit XIII₇ ließen sich jeweils in den Inkubationen von 3-Methyl-Diazepam (XII) und N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII) nachweisen. Die Chinazolinone XVIII und XIX wurden in allen Inkubationen von Diazepam (IV), XII und XIII nachgewiesen.

3. Präkursoren der Chinazolinone XVIII und XIX

Erste Hinweise für die Entstehung der Ringverengung zu Chinazolinonen ergaben sich aus der Betrachtung der DC-Platten aufgetrennter Inkubate von XII und XIII nach vierundzwanzigstündigem Lagern an der Luft. Im UV-Licht bei 254 und 360 nm zeigten die 3-hydroxilierten Metaboliten XII₈ und XIII₅ zuvor nicht beobachtete grüne Fluoreszenzen, die für Chinazolinone typisch sind.

Die fluoreszierenden Banden wurden von der Platte abgeschabt, mit Methanol eluiert und in Fl 5 und Fl 10 mit den Substanzen XVIII und XIX verglichen. Die R_f-Werte waren identisch. Inkubationen von 3-Hydroxi-Verbindungen als mögliche Zwischen-

den Banden wurden von der Platte abgekratzt, mit Methanol eluiert und mit den Referenzsubstanzen in Fl 5 verglichen. Auch hier zeigten die entsprechenden Vergleiche mit den fluoreszierenden Metaboliten gleiche Rf-Werte. Die UV-Absorption und die Anregungs- und Emissionsstrahlungsmaxima stimmten mit den synthetisierten Produkten XVIII und XIX überein. Es konnten jeweils folgende Chinazolinon-Metaboliten nachgewiesen werden:

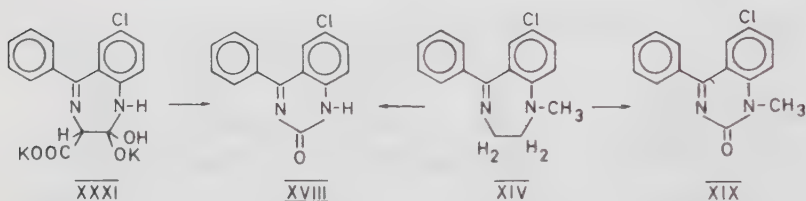


Abb. 51: Aus den Inkubationen von XIV und XXXI entstandene Chinazolinon-Metaboliten

Aus den Inkubationen äquimolarer Mengen von Diazepam (IV), Medazepam (XIV), 3-Methyl-Temazepam (XX) und Dikalium-Chlorazepat (XXXI) wurde ein jeweils gleicher Anteil des Inkubates in Fl 10 chromatographiert und die Intensität der Fluoreszenzen der Chinazolinon-Metaboliten auf der DC-Platte verglichen. Die gebildeten Mengen sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt. Die Inkubation von XXXI führte neben der Inkubation von XX zur höchsten Chinazolinon-Bildung.

Inkubation der Benzodiazepin-Derivate	Menge der gebildeten Chinazolinone	
	XVIII	XIX
Diazepam (IV)	+	++
Medazepam (XIV)	++	+++
3-Methyl-Temazepam (XX)	+++	++++
Dikalium-Chlorazepat (XXXI)	++++	--

Tab. 5: Relative Fluoreszenzen der Chinazolinone XVIII
und XIX in verschiedenen Inkubationen

4. Präkursoren der Chinazoline XV und XIII₇

Die Chinazoline XV und XIII₇ wurden in den Inkubationen von XII und XIII in sehr unterschiedlichen Mengen gebildet (Tabellen 6-8) offensichtlich stellt das N-1-Nor-Derivat XIII einen geeigneteren Präkursor der Chinazoline dar. Es ist wahrscheinlich, daß XIII₇ weiterhin durch enzymatische Reduktion aus XV entstanden war.

5. Artefakte

Die unmittelbar an die Medazepam-Inkubation anschließende dünnschichtchromatographische Untersuchung (Fl 10) ergab keinen Hinweis auf die Bildung des Chinazolin-Derivates XVII, das als Metabolit des Medazepam (XIV) beschrieben wird (22). Wurde dieselbe DC-Platte dagegen nach ca. dreistündigem Stehen an der Luft um 90° gedreht und in Fl 5 entwickelt, waren zusätzlich aus zwei Metaboliten zwei blau-violett fluoreszierende Flecken entstanden, die spektrophotofluorometrisch als XVII identifiziert wurden. So handelte es sich

möglicherweise bei dem Chinazolin-Metaboliten XVII aus dem Stoffwechsel des Medazepam (XIV) um ein Artefakt. Aufgrund dieser Ergebnisse war zu prüfen, ob die in den eigenen Inkubationen entstandenen Chinazolinon-Metaboliten ebenfalls Artefakte waren.

Um den enzymatischen Charakter der Ringverengung zu Chinazolinonen nachzuweisen, wurden Blindversuche mit den Substanzen XX, XXI, VI und XXXI angesetzt. Die Kontrollinkubationen enthielten:

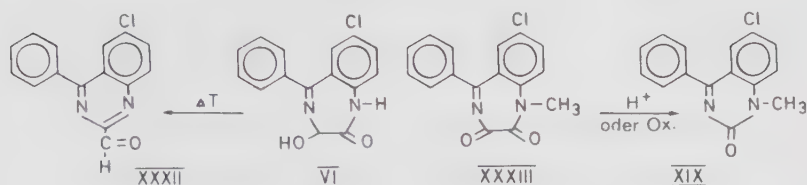
- 1) Substrat und Wasser
- 2) Substrat und Mikrosomensuspension
- 3) Substrat und Inkubationsmischung
- 4) Substrat und Inkubationsmischung mit Mikrosomen

In allen Inkubationen entstanden nur bei der Verwendung der Inkubationsbedingung 4) Chinazolinone. Eine Ausnahme stellte XX dar, das unter allen aufgeführten Bedingungen XIX bildete. Die Bedingungen 1) - 3) ließen einen geringen Anteil XIX aus XX entstehen. Bei der Inkubation von XX unter Bedingung 4) war deutlich ein Anstieg der Bildung von XIX gegenüber den Bedingungen 1) - 3) festzustellen.

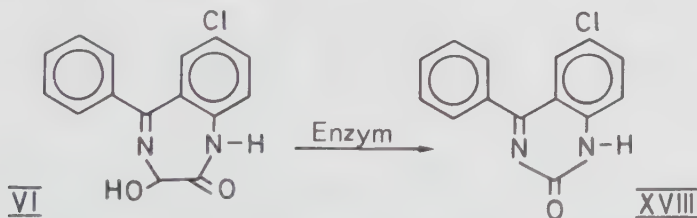
6. Diskussion

Eine Reihe von chemischen Umlagerungsreaktionen von 1,4-Benzodiazepinen sind in der Literatur beschrieben worden, die zu sechsgliedrigen Chinazolin-Ringsystemen führen, so z.B. die Bildung des Chinazolin-2-carboxaldehyd XXXII aus Oxazepam (VI) durch Erhitzen (72) und die Bildung des Chinazolinon XIX aus dem 2,3-Dioxo-benzodiazepin XXXIII

durch Säureeinwirkung oder Oxidation mit RuO_4 (71).



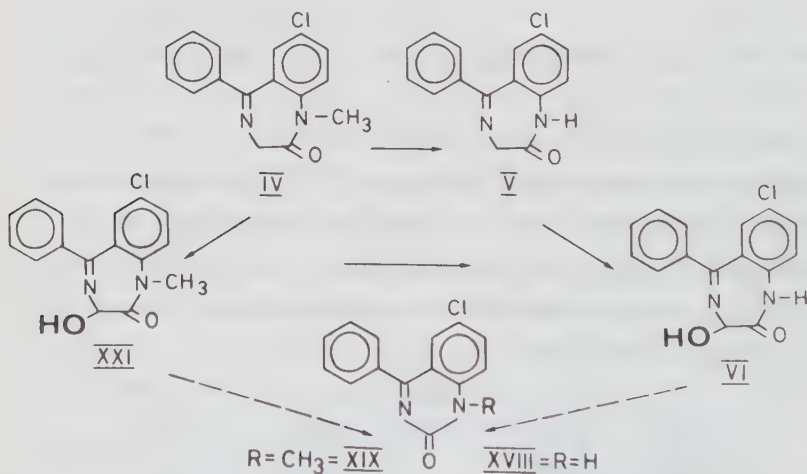
Unabhängig von unseren Untersuchungen wurden inzwischen das Chinazolinon XVIII aus Rattenlebermikrosomeninkubationen von Oxazepam (VI) (76) und ein analoges Chinazolinon des Lorazepam (77) isoliert. Wir konnten ebenfalls Chinazolin-Derivate in Mikrosomeninkubationen aller verwendeten Benzodiazepine nachweisen, wenn auch in sehr unterschiedlichen Mengen (Diazepam (IV), 3-Methyl-Diazepam (XII), N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII), Medazepam (XIV), 3-Methyl-Temazepam (XX), 3-OH-Diazepam (XXI) und Dikalium-Chlorazepat (XXXI)). Bei Kenntnis der Mechanismen der Umlagerungsreaktionen ließen sich möglicherweise die zu erwartenden Mengen an Chinazolinon-Metaboliten voraussagen.



Dieses erscheint wichtig, da weiterhin neue 1,4-Benzodiazepin-Derivate zum klinisch therapeutischen Gebrauch entwickelt werden. Es sollte darauf hingewiesen werden, daß die

Chinazolin-Derivate XXXII, XVIII und XIX im Gegensatz zu den Benzodiazepinen keine pharmakologische Wirkung auf das ZNS besitzen (68, 97), jedoch toxikologische Probleme dieser ringverengten Produkte bisher unberücksichtigt blieben.

Als metabolische Präkursoren der Chinazolinone XVIII und XIX ließen sich 3-OH-Benzodiazepine feststellen, deren Inkubationen jeweils zu höheren Ausbeuten der Umlagerungsprodukte als Benzodiazepine ohne 3-OH-Gruppe führten. Die Reaktionsfolge der Chinazolinon-Bildung ist am Beispiel des Diazepam (IV) dargestellt.

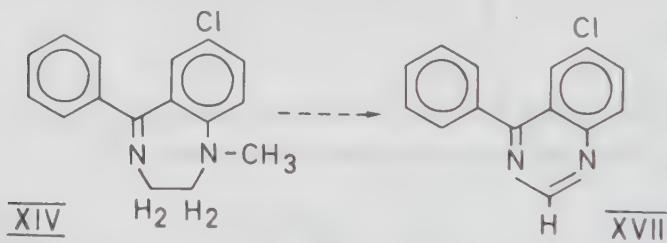


Hierbei ließ es sich jedoch nicht feststellen, ob Verbindungen vom Typ des erwähnten 2,3-Oxo-Derivates XXXIII eine weitere Zwischenstufe darstellten.

Zur Untersuchung des Reaktionsmechanismus erwiesen sich die 3-Methylanalogen des Diazepam (XII und XIII) als Modellsubstanzen aus den folgenden Gründen geeignet:

Die Inkubationen von XX führten jeweils zu den höchsten Ausbeuten an Chinazolin-Derivaten, in diesem Fall hauptsächlich zu XIX. Die Umwandlung von XX zu XIX kann dabei teilweise auch nicht enzymatisch ohne Zugabe von Rattenlebermikrosomen zur Inkubation erfolgen. Alle anderen Metabolisierungsschritte waren rein enzymatischer Natur.

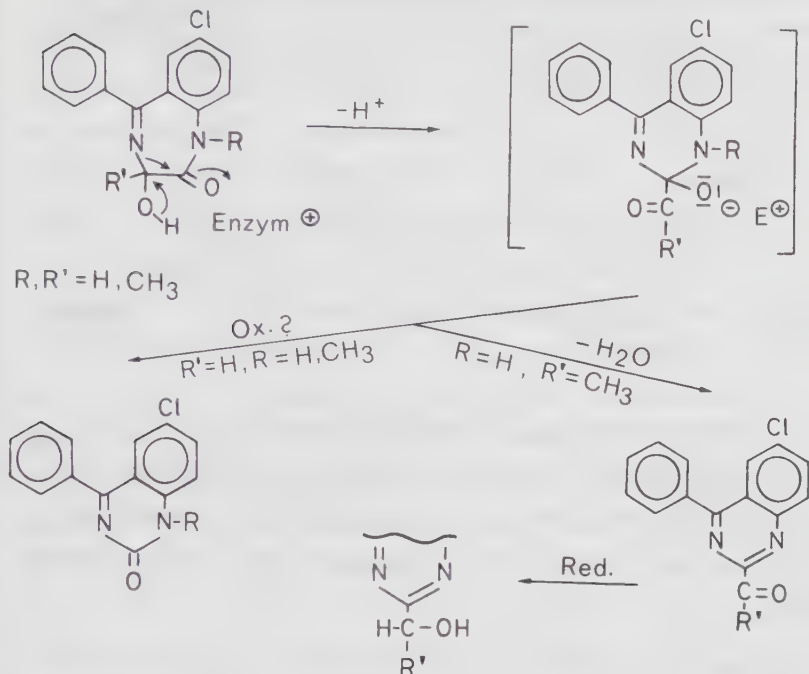
Voraussetzung zur Bildung der Chinazoline XV und XIII₇ ist das Fehlen der N-1-Methylgruppe. Entsprechende Chinazoline ließen sich aus Inkubationen von Benzodiazepinen ohne 3-Methylierung noch nicht sicher nachweisen. Ebenso konnten wir das von Rieder und Mitarbeitern beschriebene Chinazolin XVII (22) dünnschichtchromatographisch aus Rattenlebermikrosomeninkubationen des Medazepam (XIV) nicht nachweisen.



Erst nach mehrstündigem Stehen der Dünnschichtplatten mit aufgetrennten Inkubat an der Luft traten die für XVII charakteristischen Fluoreszenzen auf, und das Chinazolin XVII ließ sich erst dann identifizieren. Es handelte sich hier also möglicherweise um einen bei der Aufarbeitung entstandenen Artefakt.

Aufgrund dieser Untersuchungen kann folgender Mechanismus

der Umlagerung zu Chinazolin-Derivaten angenommen werden:

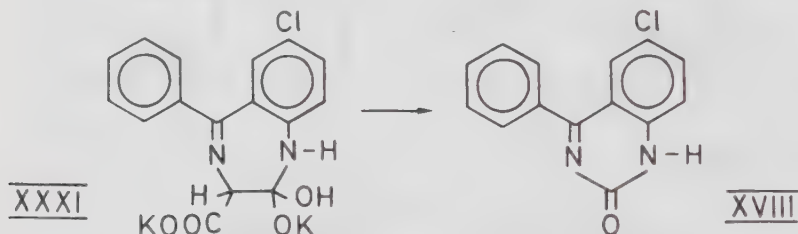


Vermutlich wird eine gemeinsame instabile Zwischenstufe enzymatisch gebildet, die dann entweder durch Kondensation die Chinazoline XV und XIII₇ bildet oder zu den Chinazolinonen XVIII und XIX abgebaut wird. Hierbei handelt es sich voraussichtlich um eine oxidative Eliminierung der Seitenkette, die entweder enzymatisch oder nicht-enzymatisch durch Luftsauerstoff erfolgen kann.

Einen chemischen Sonderfall stellt das therapeutisch verwendete Dikalium-Chlorazepat (XXXI) dar, das ebenfalls in Stellung 3 substituiert ist.

XXXI wird zu Oxazepam (VI) als Hauptmetaboliten abgebaut (95, 96), das das pharmakologisch aktive Prinzip darstellen

soll. Aus den Inkubationen mit Dikalium-Chlorazepat (XXXI) konnten wir eine wesentlich höhere Ausbeute des Chinazolinon XVIII erhalten, als aus Inkubationen des Oxazepam (VI).



Es ist daher wahrscheinlich, daß XVIII direkt aus XXXI und nicht über Oxazepam (VI) gebildet wird. Bei zukünftigen in vivo Untersuchungen über die Pharmakokinetik des Chlorazepat sollte daher die Bildung des Chinazolinon XVIII berücksichtigt werden.

D Einfluß der Enzyminduktion und des Metyrapon auf den in
 =====
 vitro Metabolismus von Diazepam (IV), 3-Methyl-Diazepam (XII),
 =====
 N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII) und Medazepam (XIV)
 =====

I Es gibt Substanzen, die induzierend auf den Metabolismus wirken. Langzeitwirksame Barbiturate, wie Phenobarbital und auch Carcinogene, wie 3-Methyl-chloranthren, induzieren den Metabolismus körperfremder Substanzen (98, 99). Durch wiederholte Injektion von Phenobarbital bei jungen Ratten wird die Leber um 20 - 30 % schwerer und es kommt zu einer Vermehrung des reinen Leberproteins um ca. 80 % gegenüber nicht behandelten Kontrolltieren (19, 100). Die vermehrte Bildung des glatten endoplasmatischen Retikulums konnte

elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden (100). Gelboin und andere Autoren konnten einen vermehrten Einbau von Aminosäuren in Lebermikrosomen durch radioaktive Markierung nachweisen (101-103). Die Bildung des Cytochrom P 450, das in Lebermikrosomen vorhanden ist (104, 105), wird ebenfalls angeregt (14, 106). Auch beim Menschen fand man eine erhöhte Metabolisierungsrate von Arzneimitteln durch vorausgegangene Gaben von Barbituraten oder von Phenylbutazon (107, 108).

Werden weibliche Ratten mit Phenobarbital vorbehandelt und der Metabolismus von Hydrocortison verfolgt, so ergibt sich keine Veränderung des quantitativen Verhältnisses der Metaboliten im Vergleich zu unbehandelten Tieren, wohl aber entstehen zusätzliche Metaboliten (109). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß das Cytochrom P 450 Oxygenase-System möglicherweise in zwei oder mehr verschiedenen Formen existiert, die auf Enzyminduktion unterschiedlich reagieren. Im Gegensatz zur Induktion der Enzymaktivität bewirken Verbindungen wie CO, SKF-525 A⁺⁺⁺, Metyrapon und Sulfaphenazol eine Inhibierung des oxidativen Metabolismus.

Hemmstoffe können auf unterschiedliche Weise wirken:

Einige treten in Wechselwirkung mit NADPH-regenerierenden Systemen, andere blockieren höchstwahrscheinlich die Übertragung des "aktiven Sauerstoffs" auf das Substrat (6). In vielen Fällen greift der Hemmstoff direkt am Cytochrom P 450 an und verhindert auf diese Weise seine Reduktion durch einen noch unbekannten Kofaktor (110-113). Aus diesem Grunde

⁺⁺⁺ Diäthylaminoäthyl-diphenylpropylacetat

kann nur noch bedingt "aktiver Sauerstoff" gebildet werden, und die Aktivität oxidierender Enzymsysteme wird entsprechend geringer. Mit Hilfe von physikalisch-chemischen Methoden lassen sich übereinstimmend mit den Untersuchungen über Enzyminduktion zwei verschiedene Formen des Cytochrom P 450 nachweisen, die möglicherweise unterschiedliche Konformationen des Cytochroms darstellen und jeweils in der Fe-II- oder in der Fe-III-Oxidationsstufe existieren können. ESR-Untersuchungen an der oxidierten Fe-III-Form führten zu den Begriffen "low spin"- und "high spin"- Cytochrom P 450, während UV-spektrofotometrische Merkmale an Fe-II- und Fe-III-Form eine korrelierende Einteilung in Typ I und Typ II zuließen.

Die verschiedenen Substrate und Hemmstoffe bewirken unterschiedliche Veränderungen des UV-Spektrums des Cytochrom P 450. Die nach Hemmstoffzugabe zum Cytochrom erhaltenen UV-Spektren werden als Differenzspektren bezeichnet. Besitzt der Cytochrom P 450-Substrat-Komplex UV-Minima bei 420, 530 nm und ein breites Maximum bei 385 nm, ergibt sich ein Typ-I-Differenzspektrum (114, 115). Typ-II-Differenzspektren zeigen Absorptionsmaxima bei ca. 430, 550 und 580 nm und ein Minimum bei 390 nm (115).

Metirapon* bildet mit dem Cytochrom P 450 ein Typ-II-Differenzspektrum (116) und hemmt das Cytochrom P 450 kompetitiv (117). Es ist jedoch bemerkenswert, daß Metirapon lediglich die Oxygenierung von Substanzen inhibiert, die ein Typ-I-Differenzspektrum mit dem Cytochrom P 450 bilden.

*Metirapon: 2-Methyl-1,2-di-(3-pyridyl)-1-propanon

Der folgende Abschnitt der Arbeit soll den Einfluß der Enzyminduktion durch Phenobarbital auf den in vitro Metabolismus von Diazepam (IV) und seiner β -Methylanalogen XII und XIII untersuchen. Die Benzodiazepin-2-one wurden als Modell zur Untersuchung der verschiedenen möglichen Formen des Cytochrom P 450 verwendet, da das Ringgerüst gleichzeitig an mehreren Stellen oxidativ metabolisiert wird. Durch Inkubation des in Stellung 2 unsubstituierten Medazepam (XIV) kann zusätzlich der Einfluß der Enzyminduktion auf die C-2-Hydroxilierungsrate untersucht werden.

Bei Inkubationen von 1,4-Benzodiazepinen mit Rattenlebermikrosomen entstehen Oxidationsprodukte, die entweder demethyliert, in Stellung 2 oder 3 oder an den Aromaten hydroxyliert sind. Aufgrund zahlreicher Untersuchungen kann angenommen werden, daß diese Reaktionen vorwiegend durch das Cytochrom P 450-System katalysiert werden. Ringverengungen des Heterocyclen laufen höchstwahrscheinlich auch über oxidative Mechanismen in Stellung 2 und 3 ab. Es war das Ziel der weiteren Untersuchungen den Einfluß der Enzyminduktion zusammen mit der Inhibierung des Cytochrom P 450 durch Metyrapon zu messen, um den Mechanismus der enzymatischen Oxygenierung zu untersuchen.

Einfluß der Enzyminduktion auf den Metabolismus von IV, XII, XIII und XIV

1. Einfluß der Enzyminduktion mit Phenobarbital auf den Metabolismus des Diazepam (IV) in vitro

Der qualitative und quantitative Verlauf des Diazepam-Metabolismus mit und ohne Vorbehandlung der Ratten mit Phenobarbital ist in Abbildung 52 und in Tabelle 6 gezeigt.

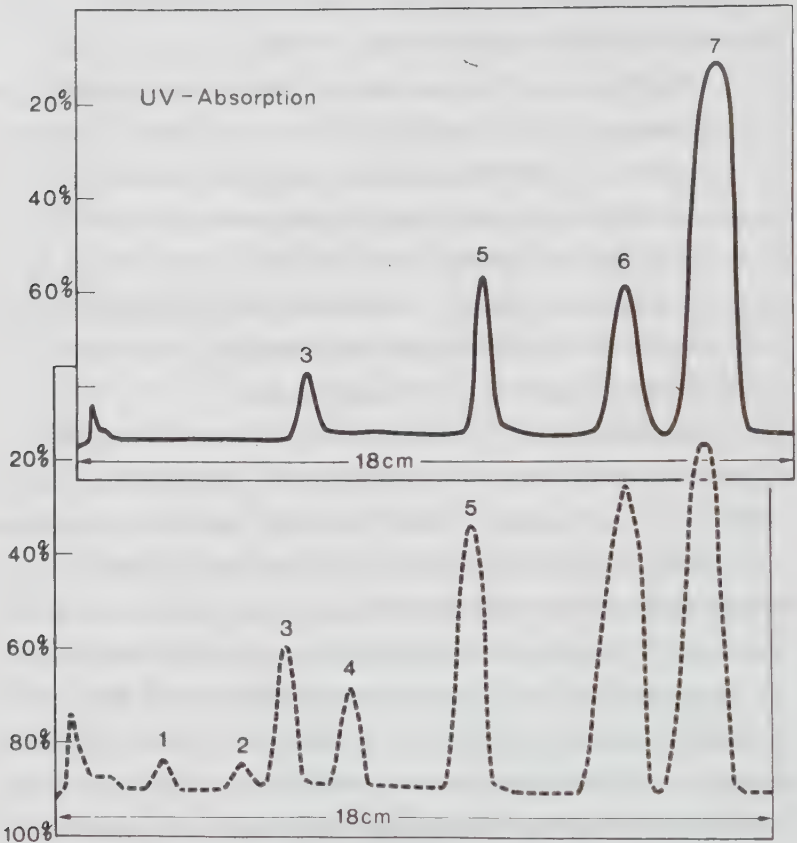


Abb. 52: Scan der nicht induzierten — und der mit Phenobarbital induzierten ---- Inkubation von Diazepam

Entsprechend dem Aufarbeitungsgang wird hier nur der mit Äther extrahierbare Teil der Metaboliten berücksichtigt. Polare Konjugate, z.B. Glucuronide wurden nicht untersucht. Ein Vergleich der Inkubationen mit induzierten und nicht induzierten Mikrosomen zeigte, daß die Bildung bestimmter

Metaboliten des Diazepam (IV) stark angeregt wurde. Andere Metaboliten dagegen wurden durch die Induktion weniger beeinflusst (Tabelle 6).

Diazepam-Metabolit		nicht induzierte Mikrosomen	mit Phenobarbital induzierte Mikrosomen
1	4'-OH-N-1-Desmethyldiazepam	---	~ 0,2 %
2	Bratton-Marshall positiv	---	---
3	4'-OH-Diazepam	~ 0,9 %	~ 1,4 %
4	3-OH-Desmethyldiazepam (Oxazepam)	---	2,8 %
5	N-1-Desmethyldiazepam	~ 3,5 %	~ 18,4 %
6	3-OH-Diazepam	~ 18 %	~ 40 %
7	Diazepam unverändert	~ 77,6 %	~ 37,2 %
		~ 100 %	~ 100 %

Tab. 6: Metabolitenprofil des Diazepam bei nicht induzierten und mit Phenobarbital induzierten Rattenlebermikrosomen-Inkubationen (60 Min.)

Diazepam wurde bei nicht induzierten Mikrosomen zu 22 % metabolisiert, die hauptsächlich aus dem 3-OH-Metaboliten 6 bestanden. Der N-1-demethylierte Metabolit 5 lag zu 3,5 % und der phenolische Metabolit 3 in einem Anteil von 1 % vor.

Durch die Enzyminduktion mit Phenobarbital wurde der Gesamtmetabolismus des Diazepam verdreifacht, während die 3-Hydroxilierung zu Metabolit 6 als Hauptmetabolisierungsschritt nur etwa um das 2,2-fache anstieg. Zusammen mit dem 3-OH-Metaboliten 4 (Oxazepam) erhöhte sich die 3-Hydroxilierung durch Enzyminduktion um den Faktor 2,4. Die Vorbehandlung

der Ratten mit Phenobarbital wirkte sich insbesondere auf die N-1-Demethylierung zu Metabolit 5 aus, die um das 5,5-fache angeregt wurde. Der Anteil der phenolischen Metaboliten wurde um ca. 60 % angehoben. Durch die Enzyminduktion traten die Metaboliten 1,2 und 4 zusätzlich auf, die bei nicht induzierten Mikrosomen nicht nachweisbar waren.

2. Einfluß der Enzyminduktion mit Phenobarbital auf den Metabolismus des 3-Methyl-Diazepam (XII) in vitro

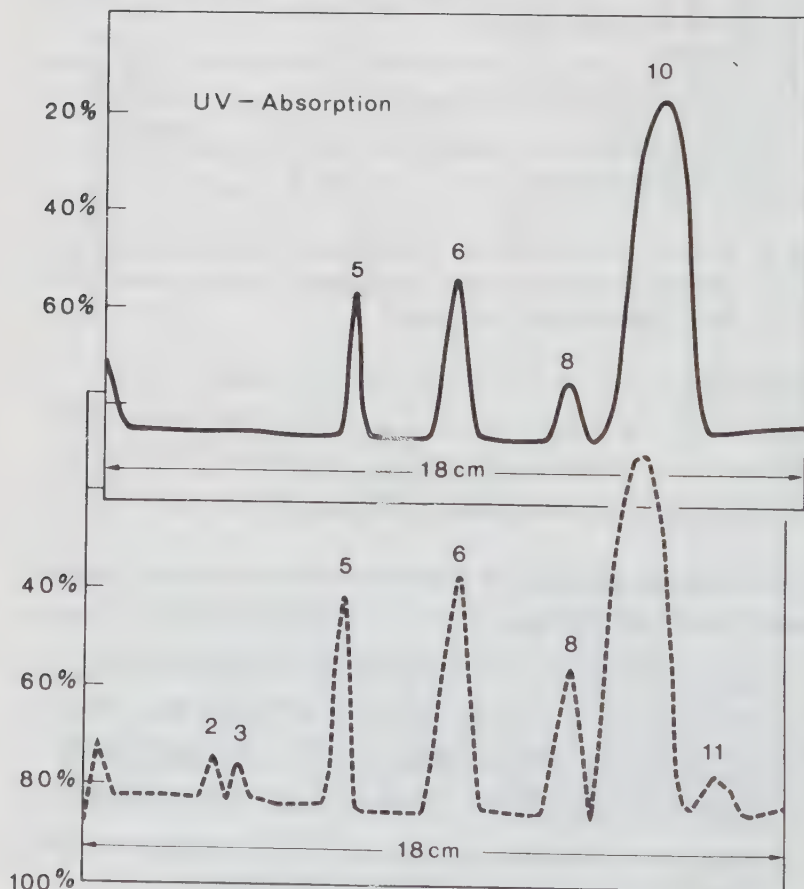


Abb. 53: Scan der nicht induzierten — und der mit Phenobarbital induzierten ---- Inkubation von 3-Methyl-Diazepam

Die folgende Tabelle 7 gibt die Änderung der Mengenverhältnisse der Hauptmetaboliten durch Enzyminduktion wieder.

Mengen von weniger als etwa 0,25 % konnten nicht mehr quantitativ ausgemessen werden.

3-CH ₃ -Diazepam-Metabolit	nicht induzierte Mikrosomen	mit Phenobarbital induzierte Mikrosomen
2 3'-CH ₃ -3-CH ₃ -Diazepam	---	~ 0,5 %
3 4'-OH-N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam	---	~ 0,5 %
4 N-1-H-1,3-Chinazolin-2-on	---	nachweisbar
5 4'-OH-3-CH ₃ -Diazepam	~ 1,4 %	~ 1,9 %
6 N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam	~ 7,6 %	~ 13,6 %
7 N-1-CH ₃ -1,3-Chinazolin-2-on	nachweisbar	induziert
8 3-OH-3-CH ₃ -Diazepam	~ 3,2 %	~ 8,5 %
9 2-Äthyl- α -OH-chinazolin	---	nachweisbar
10 3-CH ₃ -Diazepam, unverändert	~ 87 %	~ 75 %
11 2-Acetyl-chinazolin	---	nachweisbar
	~ 100 %	~ 100 %

Tab. 7: Metabolitenprofil des 3-Methyl-Diazepam bei nicht induzierten und bei mit Phenobarbital induzierten Mikrosomen

Die quasiäquatoriale Methylgruppe bei XII bewirkte eine deutliche Reduktion des Metabolismus, vor allem der 3-Hydroxilierung. Dagegen wurde die N-1-Demethylierung im Vergleich zum Diazepam (IV) verdoppelt. Der Anteil phenolischer Metaboliten mit ca. 3 % war ebenfalls leicht erhöht.

Die Enzyminduktion wirkte sich beim 3-Methyl-Diazepam etwas stärker auf die 3-Hydroxilierung als auf die N-1-Demethy-

lierung aus. Weiterhin traten die Metaboliten 4,7 und 9 auf, die durch ihre Fluoreszenz auffielen. Die Intensität der Fluoreszenz des Metaboliten 7 nahm bei der Verwendung induzierter Mikrosomen zu.

3. Einfluß der Enzyminduktion mit Phenobarbital auf den Metabolismus des N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII) in vitro

In der Abbildung 54 und der Tabelle 8 sind die entsprechenden Ergebnisse gegenübergestellt.

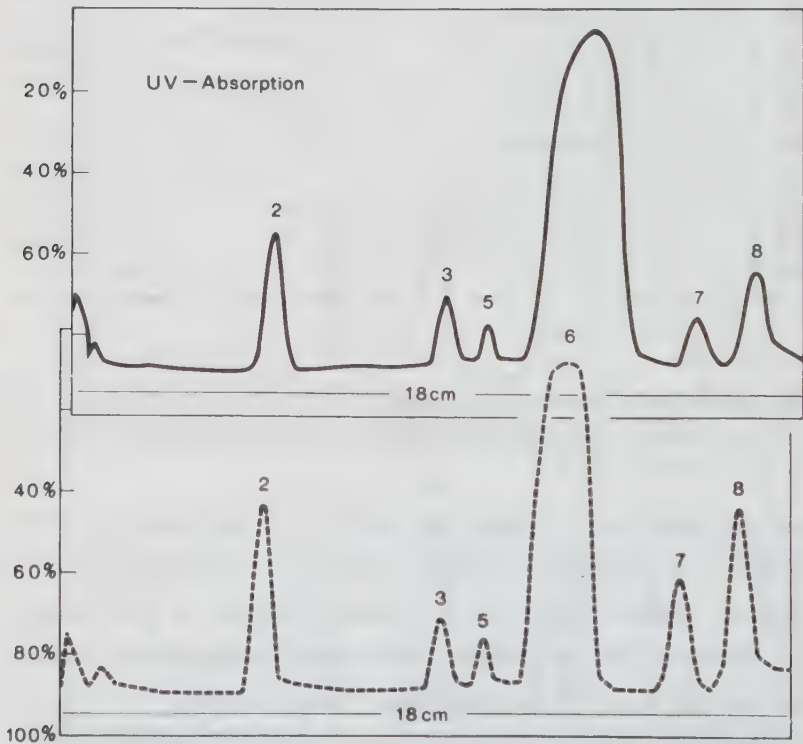


Abb. 54: Scan der nicht induzierten — und der mit Phenobarbital induzierten ---- Inkubation von N-1-Nor-3-methyl-Diazepam

N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam-Metabolit	nicht induzierte Mikrosomen	mit Phenobarbital induzierte Mikrosomen
2 4'-OH-N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam	~ 3,1 %	~ 12 %
3 3'-OH-N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam	~ 0,9 %	~ 1 %
4 N-1-H-1,3-Chinazolin-2-on	nachweisbar	induziert
5 3-OH-N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam	~ 0,5 %	~ 1 %
6 N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam, unverändert	~ 93 %	~ 79 %
7 2-Äthyl-α-OH-chinazolin	~ 1,2 %	~ 4,4 %
8 2-Acetyl-chinalzolin	~ 1 %	~ 2,2 %
	~ 100 %	~ 100 %

Tab. 8: Metabolitenprofil des N-1-Nor-3-methyl-Diazepam bei nicht induzierten und bei mit Phenobarbital induzierten Mikrosomen

N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII) wurde in den Inkubationen mit nicht induzierten Mikrosomen zu nur ca. 7 % metabolisiert. Hauptmetabolit (3,1 %) dieser Inkubationen war der Metabolit 2, der in para-Stellung des 5-Phenylringes hydroxyliert war und fast die Hälfte der gebildeten Metaboliten ausmachte. Die Metaboliten 7 und 8 mit Chinazolin-Struktur wurden in einem Anteil von insgesamt 2 % festgestellt.

Die Enzyminduktion mit Phenobarbital bewirkte einen Anstieg des Metabolismus des N-1-Nor-3-methyl-Diazepam bei nicht induzierten Mikrosomen von 6,7 % auf 21 % bei induzierten Mikrosomen. Besonders stark wirkte sich die Enzyminduktion auf die Bildung des phenolischen Metaboliten 2 aus, dessen Anteil annähernd um das Vierfache anstieg. Dieses Ergebnis wurde in mehreren Versuchen bestätigt. Die Bildung der

Chinazolin-Metaboliten 7 und 8 wurde ebenfalls stark angeregt.

4. Einfluß der Enzyminduktion auf die Hydroxilierungsrate des Medazepam (XIV) am C-2

Nachdem festgestellt worden war, daß die Hydroxilierungsrate des C-3 im Benzodiazepingerüst durch Enzyminduktion beeinflußt wird, war es von Interesse, ob am C-2 ebenfalls eine Induktion stattfindet. Als geeignetes Substrat bot sich Medazepam an, dessen C-2 unsubstituiert ist und von der Ratte zur 2-OH-Verbindung metabolisiert wird (118). Um den Anteil des enzymatisch gebildeten 2-OH-Produktes in möglichst hoher Konzentration zu erhalten und den weiteren Abbau zu verhindern, wurden Inkubationszeiten von 45 Minuten gewählt. Da nur qualitative Aussagen über die Beeinflussung der Hydroxilierung in Stellung 2 gemacht werden sollten, fand keine quantitative Messung der gebildeten Metaboliten statt.

Die Abbildung 55 zeigt die Enzyminduktion auf den Metabolismus des Medazepam.

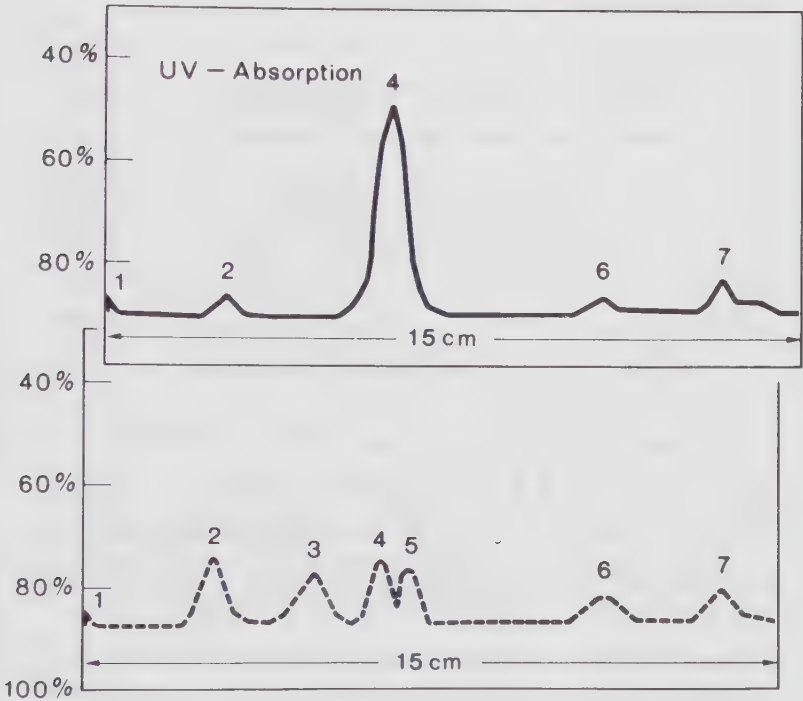


Abb. 55: Scan der nicht induzierten — und der mit Phenobarbital induzierten ---- Medazepam-Inkubation, entwickelt in Fl 5

- 1 Desmethylmedazepam (XXXIV)
- 2 2-OH-Medazepam (XXVIII)
- 3 Desmethyldiazepam (V)
- 4 Medazepam (XIV)
- 5 Diazepam (IV)
- 6 5-Chlor-2-aminobenzophenon (Benzophenon II)
- 7 5-Chlor-2-methylaminobenzophenon (Benzophenon I)

Die Identifizierung der Metaboliten erfolgte im zweidimensionalen dünnenschichtchromatographischen Vergleich mit vorhandenen Referenzsubstanzen in Fl 5, Fl 10, Fl 13 und Fl 17.

3-hydroxilierte Metaboliten wie Oxazepam (VI) und 3-OH-Diazepam (XXI) konnten nicht nachgewiesen werden.

Durch die Enzyminduktion mit Phenobarbital wird demnach die Metabolisierungsrate des Medazepam wesentlich erhöht. Die Bildung des 2-OH-Medazepam(XXVIII) wird deutlich induziert. Zusätzlich treten Desmethyldiazepam (V) und Diazepam (IV) als Metaboliten auf. Da die Metaboliten 3 (V) und 5 (IV) durch Reduktion aus 2-OH-Medazepam entstehen(118), ist der ursprüngliche Anteil des 2-OH-Metaboliten 2 entsprechend höher anzusetzen.

I Einfluß von Metyrapon auf die Enzymaktivität

1. Bei induzierten Mikrosomen

1a Diazepam (IV)
.....

Den Einfluß des Hemmstoffs auf den Metabolismus des Diazepam zeigendie Abbildung 56 und die Tabelle 9.

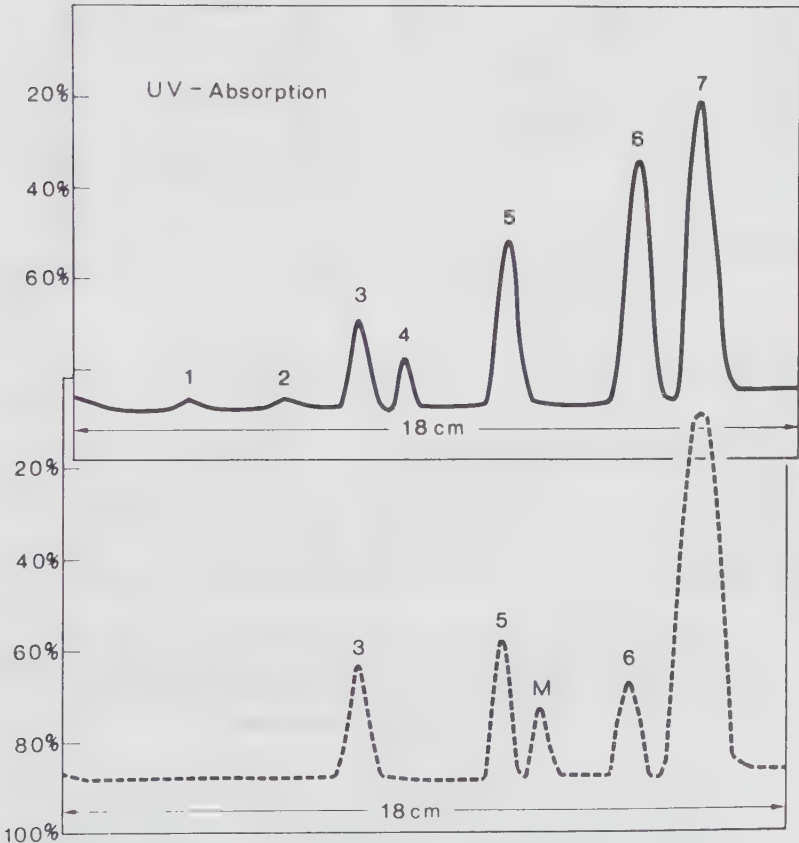


Abb. 56: Scan der mit Phenobarbital induzierten Inkubation von Diazepam — ohne Hemmstoff ---- mit Hemmstoff, M = Metyrapon

Diazepam-Metabolit	mit Phenobarbital induzierte Mikrosomen	induzierte Mikrosomen + 10^{-4} M Metyrapon
1 4'-OH-N-1-Desmethyldiazepam	~ 0,2 %	---
2 Bratton-Marshall positiv	---	---
3 4'-OH-Diazepam	~ 1,8 %	~ 2 %
4 3-OH-Desmethyldiazepam	~ 2 %	---
5 N-1-Desmethyldiazepam	~ 11 %	~ 5,2 %
6 3-OH-Diazepam	~ 36 %	~ 12,1 %
7 Diazepam, unverändert	~ 47,2 %	~ 80,7 %
	~ 100 %	~ 100 %

Tab. 9: Änderung des Metabolitenprofils von Diazepam durch Inhibierung der Enzymaktivität der mit Phenobarbital induzierten Mikrosomen

Die Metabolisierungsrate der Kontrollinkubation von Diazepam mit durch Phenobarbital induzierten Mikrosomen von ca. 52 % wurde durch die Hemmstoffzugabe auf ca. 20 % reduziert. Der Gesamtanteil phenolischer Metaboliten blieb unverändert. Dagegen wurde die N-1-Desmethylierung zu Metabolit 5 auf die Hälfte herabgesetzt. Die 3-Hydroxilierung zu Metabolit 6 wurde auf ein Drittel der ursprünglichen Konzentration erniedrigt. Die Metaboliten 1, 2 und 4 waren nach der Hemmstoffzugabe nicht mehr nachweisbar.

1b 3-Methyl-Diazepam (XII)

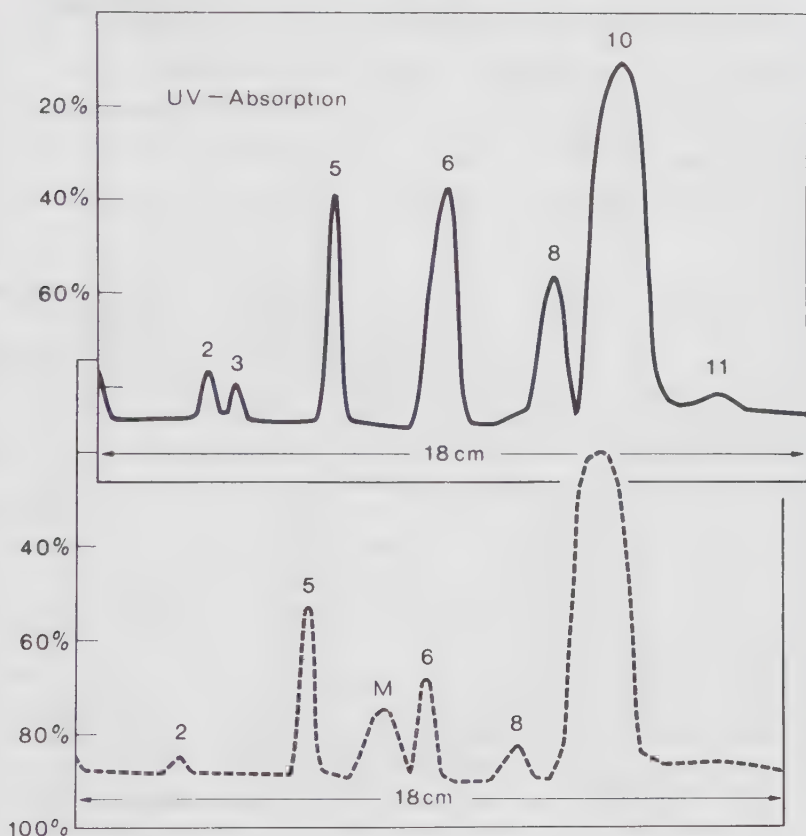


Abb. 57: Scan der mit Phenobarbital induzierten Inkubation von 3-Methyl-Diazepam — ohne Hemmstoff, ---- mit Hemmstoff M = Metirapon

Durch die Hemmstoffzugabe zu der mit Phenobarbital induzierten Inkubation von 3-Methyl-Diazepam wurde die Metabolisierungsrate von 25 % bei induzierten Mikrosomen auf ca. 8,5 % herabgesetzt. Die Demethylierung zu Metabolit 6 wurde auf ein Drittel, der 3-hydroxilierte Metabolit 8 auf

ein Viertel der Konzentration bei induzierten Mikrosomen reduziert. Der phenolische Metabolit 5 lag in den Inkubationen mit und ohne Hemmstoff in gleicher Konzentration vor. Die Metaboliten 9 und 11, die Chinazolin-Struktur aufwiesen, und die Metaboliten 3 und 4 konnten in der mit Metyrapon gehemmten Inkubation nicht mehr nachgewiesen werden.

3-CH ₃ -Diazepam-Metabolit	mit Phenobarbital induzierte Mikrosomen	induzierte Mikrosomen + 10 ⁻⁴ M Metyrapon
2 2'-OH-3-CH ₃ -Diazepam	~ 0,5 %	~ 0,3 %
3 4'-OH-N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam	~ 0,5 %	---
4 N-1-H-1,3-Chinazolin-2-on	nachweisbar	---
5 4'-OH-3-CH ₃ -Diazepam	~ 1,9 %	~ 1,9 %
6 N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam	~ 13,6 %	~ 4,4 %
7 N-1-CH ₃ -1,3-Chinazolin-2-on	induziert	nachweisbar
8 3-OH-3-CH ₃ -Diazepam	~ 8,5 %	~ 2 %
9 2-Äthyl-α-OH-chinazolin	nachweisbar	---
10 3-CH ₃ -Diazepam, unverändert	~ 75 %	~ 91,4 %
11 2-Acetyl-chinazolin	nachweisbar	---
	~ 100 %	~ 100 %

Tab. 10: Änderung des Metabolitenprofils von 3-Methyl-Diazepam durch Inhibierung der Enzymaktivität der mit Phenobarbital induzierten Mikrosomen.

1c N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII)

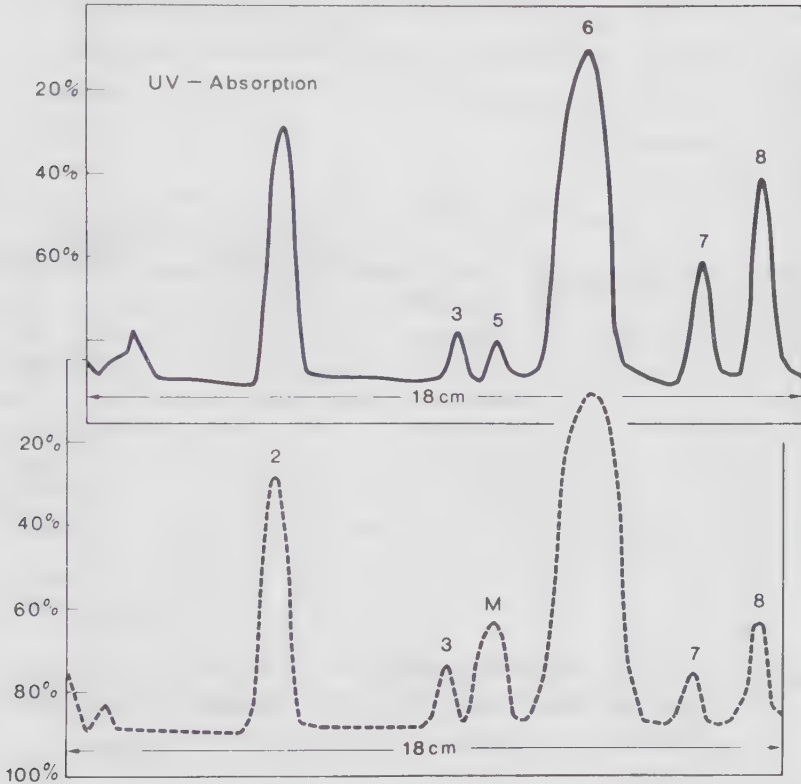


Abb. 58: Scan der mit Phenobarbital induzierten Inkubation von N-1-Nor-3-methyl-Diazepam — ohne Hemmstoff, ---- mit Hemmstoff M = Metyrapon

Der Hemmstoff Metyrapon bewirkte eine Abnahme der Umsatzrate des N-1-Nor-3-methyl-Diazepam bei mit Phenobarbital induzierten Mikrosomen um nur ca. 30 %. Die Inhibierung der Enzymaktivität wirkte sich geringfügig auf die Bildung des phenolischen 4'-OH-Metaboliten 2 aus. Weiterhin wurden

die Metaboliten 7 und 8, die Chinazolin-Struktur aufwiesen, auf ein Drittel bzw. zwei Drittel des Anteils ohne Hemmstoff reduziert. Der Metabolit 4 mit Chinazolinon-Struktur wurde ebenfalls in geringerer Konzentration durch die Hemmstoffzugabe gebildet.

N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam-Metabolit		mit Phenobarbital induzierte Mikrosomen		induzierte Mikrosomen + 10 ⁻⁴ M Metyrapon	
2	4'-OH-N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam	~ 12	%	~ 9	%
3	?'-OH-N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam	~ 1	%	~ 1	%
4	N-1-H-1,3-Chinazolin-2-on	induziert		nachweisbar	
5	3-OH-N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam	~ 1	%	nachweisbar	
6	N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam, unverändert	~ 79	%	87	%
7	2-Äthyl-α-OH-chinazolin	~ 4,4	%	~ 1,3	%
8	2-Acetyl-chinazolin	~ 2,2	%	~ 1,3	%
		~ 100	%	~ 100	%

Tab. 11: Änderung des Metabolitenprofils des N-1-Nor-3-methyl-Diazepam durch Inhibierung der Enzymaktivität der mit Phenobarbital induzierten Mikrosomen

1d Medazepam (XIV)

Wie im Teil D II 4 gezeigt wurde, konnte ein Anstieg der 2-Hydroxilierung beim Medazepam durch Enzyminduktion mit Phenobarbital festgestellt werden. Im folgenden Abschnitt wird der Einfluß von Metyrapon auf die induzierte Hydroxilierung am C-2 des Medazepam untersucht.

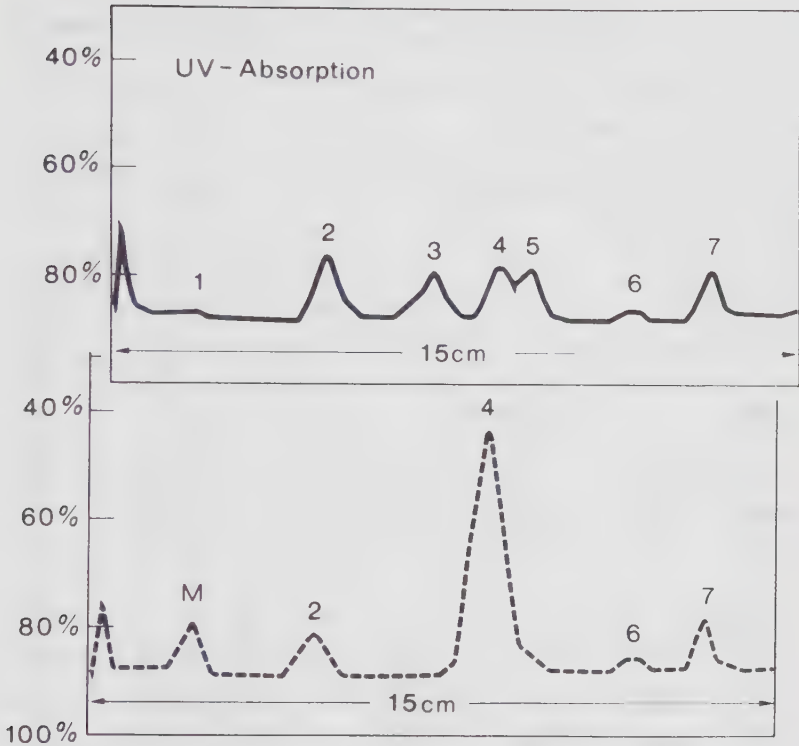


Abb. 59: Scan der mit Phenobarbital induzierten Medazepam-Inkubation — ohne Hemmstoff, ---- mit Hemmstoff
M = Metyrapon

Die Zugabe des Hemmstoff Metyrapon zu der mit Phenobarbital induzierten Inkubation von Medazepam führte zu einem deutlich verringerten Metabolismus. Der Metabolit 3 (Desmethyldiazepam) war nicht mehr nachweisbar, und vom Metaboliten 5 (Diazepam) konnten nur noch sehr geringe Mengen dünn-schicht-chromatographisch identifiziert werden. Die Konzentration des 2-OH-Metaboliten 2 verringerte sich durch die Metyrapon-

Zugabe nur wenig. Wenn man jedoch berücksichtigt, daß die Metaboliten 3 und 5 über den Metaboliten 2 gebildet werden (118), kann man insgesamt eine Reduktion der 2-Hydroxilierung durch Metyrapon feststellen.

2. Einfluß von Metyrapon auf die Enzymaktivität bei nicht induzierten Mikrosomen

2a Diazepam (IV)

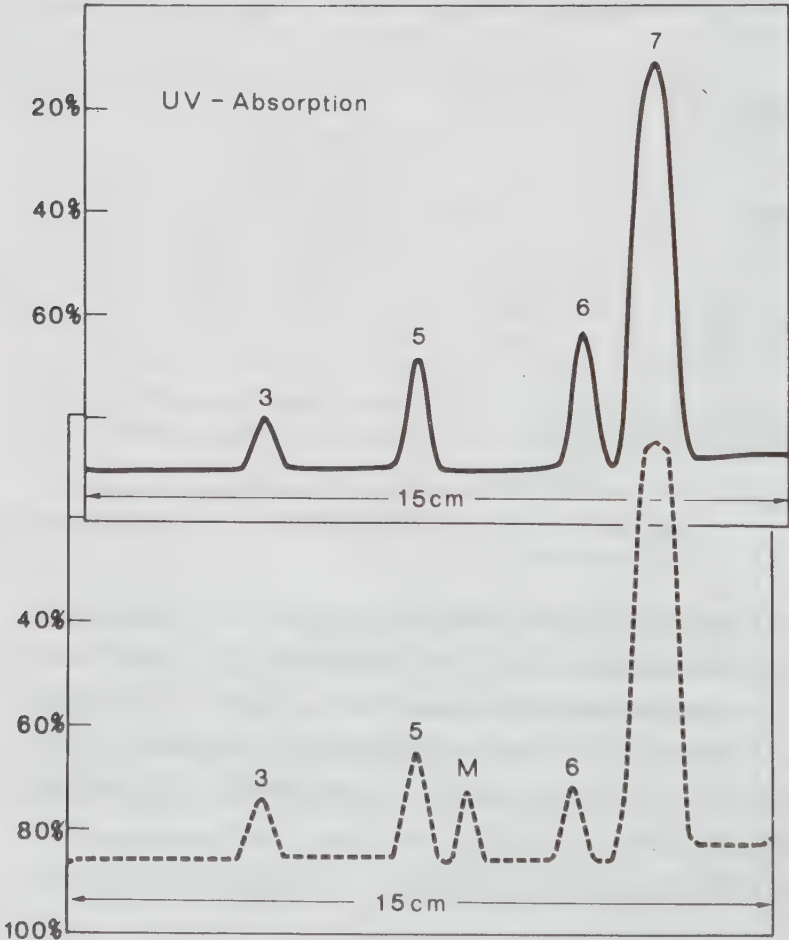


Abb. 60: Scan der nicht induzierten Diazepam-Inkubation ——— ohne Hemmstoff, ----- mit Hemmstoff M = Metyrapon

Diazepam-Metabolit	nicht induzier- te Mikrosomen	nicht induzier- te Mikrosomen + 10^{-4} M Metyrapon
1 4'-OH-N-1-Desmethyldiazepam	---	---
2 Bratton-Marshall positiv	---	---
3 4'-OH-Diazepam	~ 0,8 %	~ 0,7 %
4 3-OH-Desmethyldiazepam	---	---
5 N-1-Desmethyldiazepam	~ 3,7 %	~ 2,6 %
6 3-OH-Diazepam	~ 14 %	~ 5,7 %
7 Diazepam, unverändert	~ 81,5 %	~ 91 %
	~ 100 %	~ 100 %

Tab. 12: Änderung des Metabolitenprofils von Diazepam durch Inhibierung der Enzymaktivität nicht induzierter Mikrosomen

Durch den Hemmstoff Metyrapon wurde die Metabolisierungsrate des Diazepam bei nicht induzierten Mikrosomen von 18,5 % auf 9 % herabgesetzt. Die Bildung des phenolischen Metaboliten 3 blieb wieder gleich. Der N-1-demethylierende Schritt zu Metabolit 5 wurde um ca. 30 % verringert. Die 3-Hydroxylisierung zu Metabolit 6 fand nur noch zu 40 % gegenüber der Kontrolle statt.

2b 3-Methyl-Diazepam (XII)

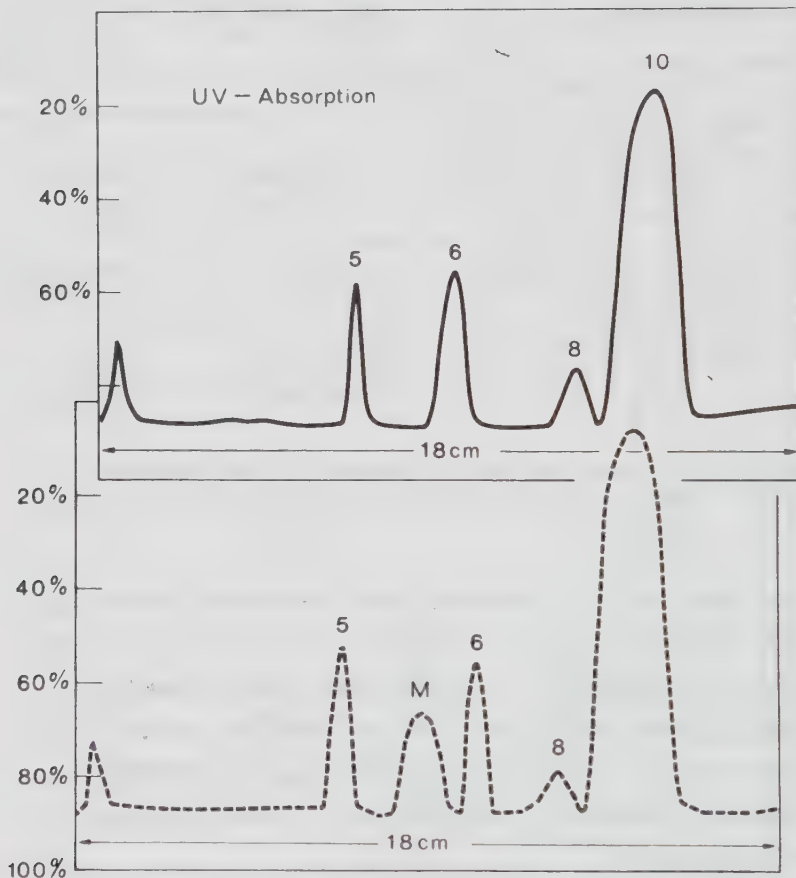


Abb. 61: Scan der nicht induzierten Inkubation von 3-Methyl-Diazepam — ohne Hemmstoff, ---- mit Hemmstoff
M = Metyrapon

Der Hemmstoff Metyrapon bewirkte eine Inhibierung der Enzymaktivität beim Metabolismus des 3-Methyl-Diazepam mit nicht induzierten Mikrosomen von 25 %. Dabei wurde die Demethylierung zu Metabolit 6 um 25 % und die 3-Hydroxilierung zu Metabolit 8 um ca. 40 % gegenüber der Inkubation ohne

Hemmstoff verringert. Die Bildung des phenolischen Metaboliten 5 wurde nicht merklich beeinflusst. Der fluoreszierende Metabolit 7 war in beiden Inkubationen nachweisbar. Insgesamt war der Einfluß von Metyrapon auf den Metabolismus des 3-Methyl-Diazepam bei nicht induzierten Mikrosomen weniger ausgeprägt als bei induzierten Mikrosomen.

3-CH ₃ -Diazepam-Metabolit	nicht induzierte Mikrosomen	nicht induzierte Mikrosomen + 10 ⁻⁴ M Metyrapon
5 4'-OH-3-CH ₃ -Diazepam	~ 1,4 %	~ 1,4 %
6 N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam	~ 7,6 %	~ 5,6 %
7 N-1-CH ₃ -1,3-Chinazolin-2-on	nachweisbar	nachweisbar
8 3-OH-3-CH ₃ -Diazepam	~ 3,2 %	~ 1,7 %
10 3-CH ₃ -Diazepam, unverändert	~ 87,2 %	~ 91,3 %
	~ 100 %	~ 100 %

Tab. 13: Änderung des Metabolitenprofils von 3-Methyl-Diazepam durch Inhibierung der Enzymaktivität nicht induzierter Mikrosomen

2c N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII)

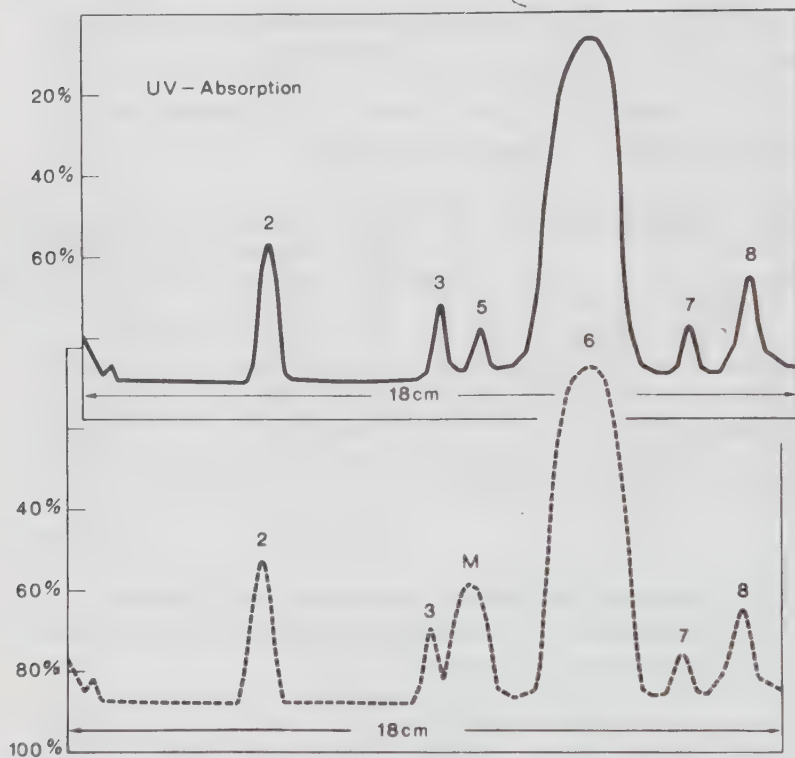


Abb. 62: Scan der nicht induzierten Inkubation von N-1-Nor-3-methyl-Diazepam — ohne Hemmstoff, ---- mit Hemmstoff M = Metyrapon

Wie die Abbildung 62 und die Tabelle 14 zeigen, konnte beim Metabolismus des N-1-Nor-3-methyl-Diazepam bei nicht induzierten Mikrosomen nach der Hemmstoffzugabe keine deutliche Veränderung des Metabolitenprofils beobachtet werden. Da die in der Tabelle 14 wiedergegebenen Konzentrationsunterschiede noch im Größenbereich des Meßfehlers lagen, war

keine Änderung der Metabolisierungsrate durch Metyrapon festzustellen.

N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam-Metabolit		nicht induzierte Mikrosomen	induzierte Mikrosomen + 10 ⁻⁴ M Metyrapon
2	4'-OH-N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam	~ 3,1 %	~ 3,2 %
3	?'-OH-N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam	~ 1,2 %	~ 1,3 %
4	N-1-H-1,3-Chinazolin-2-on	nachweisbar	nachweisbar
5	3-OH-N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam	~ 0,5 %	nachweisbar
6	N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam, unverändert	~ 93 %	~ 93 %
7	2-Äthyl-α-OH-1,3-chinazolin	~ 1,2 %	~ 1,1 %
8	2-Acetyl-chinazolin	~ 1 %	~ 1 %
		~ 100 %	~ 100 %

Tab. 14: Metabolitenprofil des N-1-Nor-3-methyl-Diazepam mit und ohne Hemmstoff bei nicht induzierten Mikrosomen

2d Medazepam (XIV)

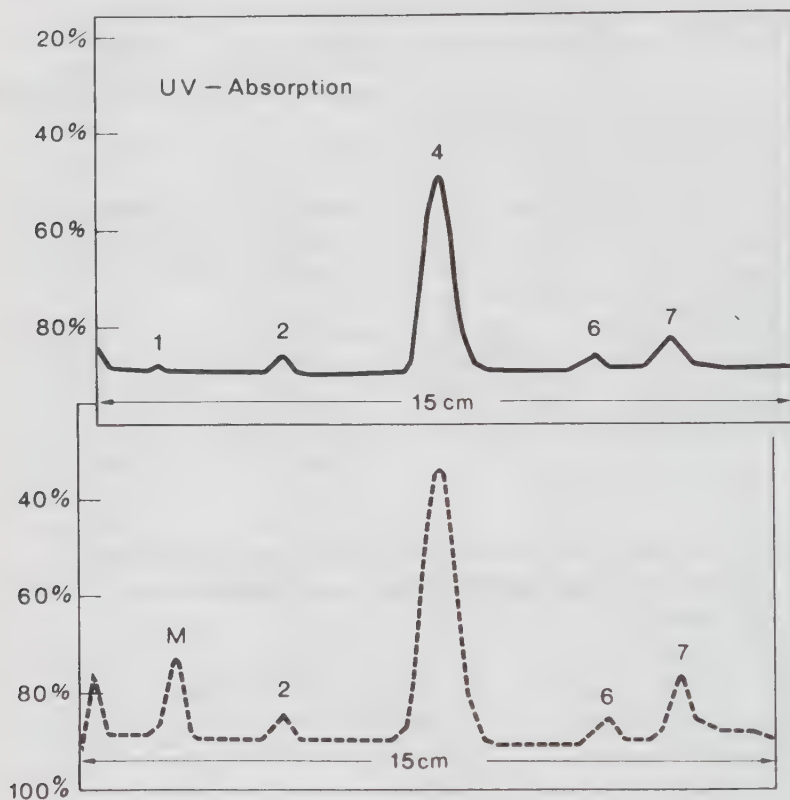
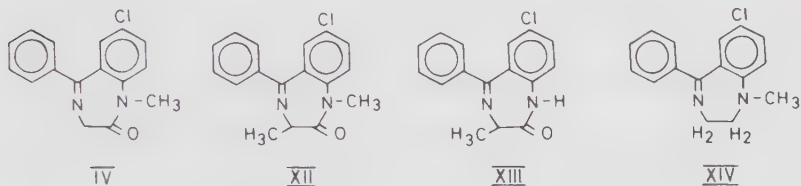


Abb. 63: Scan der nicht induzierten Inkubation von Medazepam — ohne Hemmstoff, ---- mit Hemmstoff
M = Metyrapon

Der Einfluß des Hemmstoffs auf die Hydroxilierungsrate des C-2 bei nicht induzierten Mikrosomen war gering, aber dennoch deutlich zu erkennen. Durch die Hemmstoffzugabe stieg die Konzentration des Metaboliten 7 (Benzophenon I) an.

IV Diskussion

Zur Untersuchung der mikrosomalen Oxygenierung wurden die Benzodiazepine Diazepam (IV), 3-Methyl-Diazepam (XII), N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII) und Medazepam (XIV) als Modellsubstanzen herangezogen.



Während in Kapitel C der Metabolismus dieser Benzodiazepine qualitativ behandelt wurde, ist in Kapitel D der quantitative Ablauf der einzelnen Metabolisierungsschritte beschrieben worden. Die Auftrennung der Metaboliten auf Dünnschichtplatten und das Messen der gebildeten Menge mit einem UV-Dünnschichtscanner führten zu einem Metabolitenprofil als Variable der Enzyminduktion und -inhibierung. Mit Hilfe von Eichkurven, die im experimentellen Teil wiedergegeben sind, ließen sich aus allen Inkubationen reproduzierbare Werte erhalten.

Die zum Teil im Mechanismus sehr unterschiedlichen Oxygenierungsreaktionen werden im Allgemeinen demselben Enzymsystem zugeschrieben, nämlich der NADPH- und O_2 - abhängigen Cytochrom P 450 Elektronenkette. Die Benzodiazepine IV, XII, XIII und XIV sind geeignete Modellsubstanzen für Oxygenierungsreaktionen, da chemisch sehr unterschiedliche Produkte

gebildet werden. Folgende Reaktionstypen können untersucht werden:

1. N-1-Demethylierung eines tertiären Säureamids mit Bildung von sekundärem Säureamid und Formaldehyd
2. C-2-H-Oxygenierung des Medazepam (XIV) mit Bildung eines stabilen α -Aminocarbinols
3. C-3-H-Oxygenierung mit Bildung eines stabilen α -Imino-carbinols
4. Aromatische Hydroxilierung am 5-Phenylring

Im Allgemeinen werden unterschiedliche Substrate zur Untersuchung dieser Reaktionen herangezogen. Der Vorteil der hier untersuchten Substanzen liegt darin, daß mehrere Oxygenierungen verschiedenen Typs simultan an dem gleichen chemischen Grundgerüst stattfinden und daher besser verglichen werden können. Die Untersuchungen sind geeignet festzustellen, ob ein oder mehrere Enzymsysteme für die unterschiedlichen Oxygenierungsreaktionen verantwortlich sind.

Die experimentellen Variablen, die das Metabolitenprofil beeinflussen, sind die unterschiedliche chemische Substitution im Diazepinring, die Enzyminduktion der mikrosomalen Leberfraktion durch mehrtägige Vorbehandlung der Ratten mit Phenobarbital und die spezifische Enzyminhibierung durch Metyrapon. Die Ergebnisse sind noch einmal in den folgenden beiden Tabellen 15 und 16 zusammengefaßt. Die Inkubationen des Medazepam (XIV) wurden nur semiquantitativ ausgewertet.

Chemische Substitution: Der Einfluß der Substituenten auf das Metabolitenprofil ist bereits in den vorangegangenen Kapiteln diskutiert worden. Es sei noch einmal darauf hin-

gewiesen, daß die Substitution in N-1 und C-3 mit Methylgruppen die Metabolisierung des Benzodiazepinringes beeinflusst. Ist eine Demethylierung am N-1 wie bei XIII nicht möglich, kommt es bevorzugt zur Bildung von Phenolen (Tabelle 16). Bei der quantitativen Auswertung der Inkubationen fällt auf, daß bei fehlender Konkurrenzreaktion im Diazepinring der Anteil der Phenole durch 4'-Hydroxilierung unverhältnismäßig stark ansteigt. Dieses Verhalten deutet darauf hin, daß eine oder mehrere Komponenten des Oxygenierungssystems sowohl für die aromatische Hydroxilierung als auch für die Oxygenierung des Diazepinringes identisch sind. Über die Art dieser gemeinsamen Komponente, z.B. Reduktionsäquivalente und Elektronentransportkette oder Cytochrom P 450, läßt sich z.Zt. noch keine Aussage machen.

Enzyminduktion: Es ist bekannt, daß durch Vorbehandlung mit Phenobarbital eine Vielzahl von mikrosomalen Enzymen in ihrer Aktivität gesteigert werden und dabei die Oxygenierungstypen unterschiedlich beeinflusst werden. Dies läßt sich am Beispiel der Benzodiazepine demonstrieren (Tabelle 15). Die Menge der oxidativen Produkte des Diazepam (IV), 3-Methyl-Diazepam (XII) und N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII) stieg unterschiedlich um das 1,4 - 3-fache an. Es ließ sich jedoch nicht feststellen, daß die Enzyminduktion nur auf eine bestimmte Oxygenierungsreaktion beschränkt war. Vielmehr wurde die Oxygenierung weitgehend von der Art der Substitution beeinflusst.

	nicht induziert	Phenobarbital-induziert	
Diazepam	18,5%	53,0%	ohne Hemmstoff
	9,0%	19,0%	mit Metyrapon
3-CH ₃ -Diazepam	13,0%	25,0%	ohne Hemmstoff
	9,0%	9,0%	mit Metyrapon
N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam	7,0%	21,0%	ohne Hemmstoff
	7,0%	13,0%	mit Metyrapon

Tab. 15: Prozentualer Anteil der mit Äther extrahierbaren Metaboliten verschiedener 1,4-Benzodiazepine mit und ohne Vorbehandlung der Mikrosomen mit Phenobarbital oder nach Hemmstoffzugabe

Inhibierung mit Metyrapon: Metyrapon gilt als spezifischer Hemmstoff der Cytochrom P 450 Oxigenase, mit der es ein Typ II-Differenzspektrum bildet. Im Gegensatz zum mitochondrialen Cytochrom P 450 in den Nebennieren ist jedoch die mikrosomale P 450 der Leber noch nicht rein dargestellt worden, so daß der Mechanismus der Metyrapon-Inhibierung noch nicht genau aufgeklärt werden konnte. Es ist bekannt, daß Metyrapon die Oxygenierungstypen in sehr unterschiedlichem Maße inhibiert. Folgende Erklärungen für dieses Verhalten sind möglich:

1. Metyrapon inhibiert nur Substrate, die ein Typ I-Differenzspektrum ("high spin" des Häm-Fe-III) bilden.
2. Es existieren mehrere P 450 Oxigenasen, die in ihrer chemischen Struktur unterschiedlich sind und das Metyrapon unterschiedlich binden. Dies ist für das adrenale Cytochrom P 450 nachgewiesen worden (119).

3. Es existieren zwei Bindungsstellen an derselben P 450 Oxygenase, erstens direkt am Eisen durch Ligandenbildung mit den freien Elektronenpaaren des Metyrapon und zweitens an der Substrat-Bindungsstelle (113).
4. Eine Reihe der Oxygenierungen wird nicht durch das Cytochrom P 450 System, sondern durch andere oxidative Enzyme katalysiert, z.B. durch Peroxidasen. Diese Möglichkeit ist in den vorliegenden Untersuchungen nicht auszuschließen, da zur Inkubation der 19000 x g - Überstand verwendet wurde und das Cytochrom P 450 nicht weiter aufgereinigt wurde.

In der folgenden Graphik ist die Hemmung der drei Haupt-Oxygenierungsschritte des Diazepam durch unterschiedliche Metyrapon-Konzentrationen dargestellt (UV-Absorption).

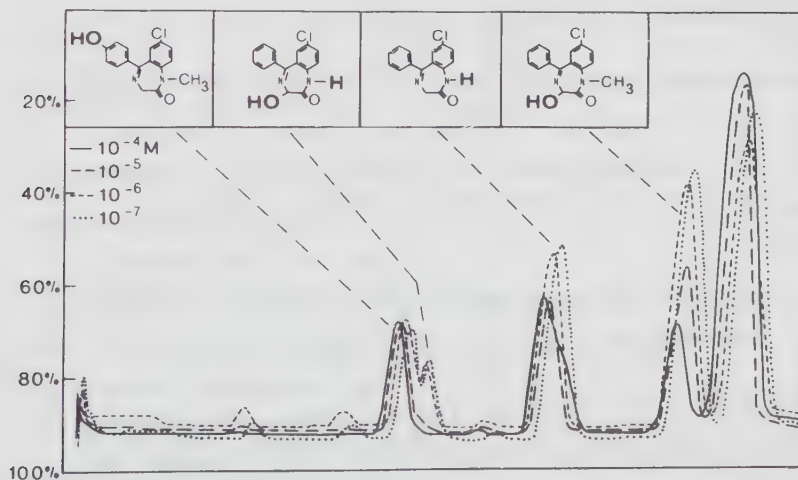


Abb. 64: Metabolitenprofiländerung des Diazepam durch unterschiedliche Metyrapon-Konzentrationen.

Die unterschiedliche Hemmwirkung läßt sich hier besonders gut entnehmen (siehe auch Tabelle 16). Am stärksten wird die 3-Hydroxilierung beeinflußt, der Einfluß auf die N-1-Demethylierung ist geringer. Eine Hemmwirkung auf die aromatische 4'-Hydroxilierung ist sehr schwach oder nicht nachweisbar. Beim Diazepam wird also lediglich eine Hemmung der Oxygenierungsreaktionen an C-H-Bindungen beobachtet, die einem Stickstoffatom benachbart sind. Weiterhin wird die Oxygenierung am C-3, das neben dem Stickstoffatom mit der größten Elektronendichte (N-4) liegt, stärker gehemmt als die Oxygenierung des N-1-CH₃, das dem N-1-Stickstoffatom mit weit schwächerer Ladungsdichte benachbart ist. Wir gehen hierbei davon aus, daß die N-Demethylierung über ein Aminocarbinol abläuft, das dann spontan zu Formaldehyd zerfällt, so daß beide Reaktionen direkt vergleichbar sind.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß im Falle des Diazepam für die Hemmwirkung des Metyrapon eine direkte Ligandenbindung des Substratstickstoffs an das Häm-Eisen ausschlaggebend ist. Die C-2-Oxygenierung des Medazepam wird ebenfalls durch Metyrapon gehemmt. Dieser Schritt läßt sich jedoch nicht quantitativ im Vergleich zu anderen Reaktionen auswerten, da Medazepam (XIV) keine 2-on-Struktur besitzt.

Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um den Mechanismus der Hemmung abzuklären und dadurch ein besseres Verständnis der Cytochrom P 450 Oxygenase zu erhalten. Diazepam und seine Analogen scheinen ein interessantes Modellsystem darzustellen, das weitere Beachtung verdient.

Enzyminduktion und Metyrapon-Hemmung: Als zusätzliche Fragestellung sollte untersucht werden, ob die Vorbehandlung mit Phenobarbital die Bildung von identischem oder qualitativ unterschiedlichem Cytochrom P 450 induziert. Daher wurde die Hemmwirkung von Metyrapon auf Inkubationen mit induzierten und nicht induzierten Rattenlebermikrosomen verglichen (Tabelle 15 und 16).

	N-1-Demethylierung		C-3-Hydroxilierung		C-4'-Hydroxilierung		
	nicht induziert	Phenobarb.-induziert	nicht induziert	Phenobarb.-induziert	nicht induziert	Phenobarb.-induziert	
Diazepam	3,7	11,0	14,0	36,0	0,8	1,8	ohne Hemmstoff
	2,6	5,2	5,7	12,1	0,7	2,0	mit Metyrapon
3-CH ₃ -Diazepam	7,6	13,6	3,2	8,5	1,4	1,9	ohne Hemmstoff
	5,6	4,4	1,7	2,0	1,4	1,9	mit Metyrapon
N-1-Nor-3-CH ₃ -Diazepam	----	----	0,5 (2,7)*	1,0 (7,6)*	3,1	12,0	ohne Hemmstoff
	----	----	0,25 (2,3)*	0,25 (2,8)*	3,2	9,0	mit Metyrapon

* Chinazolinbildung über 3-Hydroxilierung einbezogen

Tab. 16: Anteil verschiedener Metabolisierungsschritte am Gesamtmetabolismus in Abhängigkeit verschiedener Faktoren

In jedem Fall lag die relative Hemmwirkung bei Inkubationen mit induzierten Mikrosomen wesentlich höher als bei nicht induzierten Mikrosomen. Die Empfindlichkeit des Oxigenase-systems gegenüber Metyrapon war also durch Enzyminduktion erhöht und läßt auf qualitative Unterschiede des Oxigenase-systems schließen.

Verschiedene Enzyminduktoren, z.B. Spironolakton, führen ebenfalls zu einer unterschiedlichen Anregung der Oxidationstypen, wie aus zahlreichen Arbeiten in der Literatur be-

kannt ist (120, 121). Hier scheinen Diazepam und seine Analogen ebenfalls als Modell für weitere Untersuchungen geeignet zu sein.

E Experimenteller Teil
=====

I Geräte

a) UV-Absorptionsspektren von Lösungen wurden mit einem Zeiss-Phometer M 4 Q II gemessen.

b) Die UV-Absorption dünnschichtchromatographisch aufgetrennter Substanzen wurde mit einem Zeiss-DC-Scanner mit Serogor-Kompensationsschreiber direkt von der DC-Platte bei 320 nm und konstantem Empfängerabstand aufgenommen. Die Geschwindigkeit des Plattenvorschubs betrug 60 mm/Min., die des Schreibers 120 mm/Min.

c) Spektrophotofluorometrische Messungen erfolgten mit dem Gerät M 4 Q III der Firma Zeiss. Durch Regulierung der Spaltbreite wurde eine maximale Fluoreszenz von ca. 80 % eingestellt.

d) IR-Absorptionsspektren wurden mit den Perkin-Elmer-Spektralphotometern 237 und 421 in KBr aufgenommen. Spektren von geringen Metabolitenmengen (50 - 100 µg) wurden mit KBr - Mikropresslingen (ca. 3 mg) nach der Wick-Stick-Methode angefertigt.

e) NMR-Spektren wurden mit einem Varian-Gerät Typ A-60 A bei 60 MHz in den angegebenen Lösungsmitteln aufgenommen. TMS diente als innerer Standard. Das Spektrum des Metaboliten XIII₇ wurde mit einem 90 MHz-Gerät der Firma Bruker

Spectrospin mit Fourier Transform an Protonen (ohne TMS als Standard) aufgenommen⁺. Die 100 MHz-Spektren mit CAT der Metaboliten XII₃ und XIII₂ wurden mit dem Gerät S-XL-100 der Firma Varian angefertigt⁺⁺. Als innerer Standard diente TMS.

f) Molekulargewichtsbestimmungen erfolgten massenspektrometrisch mit einem Gerät der Firma Varian, Typ CH 7 Varian MAT. (Ionisationsspannung 70 eV).

g) Schmelzpunkte wurden im Lindströmblock ermittelt und sind unkorrigiert angegeben.

h) Ausbeuten beziehen sich auf einmal umkristalisierte und getrocknete Substanzen.

i) pH-Werte wurden elektrometrisch mit einem pH-Meter, Typ 260 der Firma Knick eingestellt, das Gerät wurde mit Eichpufferlösungen geeicht.

j) Elementaranalysen wurden am Pharmazeutischen Institut der FU Berlin angefertigt.

Zur dünnschichtchromatographischen Trennung und Identifizierung von Substanzen wurden Merck-Platten 20 x 20 cm, Schichtdicke 2,5 mm mit Fluoreszenzindikator verwendet (KG - Merck F 254).

Die Kammern wurden mit Fließpapier ausgekleidet. Durch Umschütteln des Fließmittels in der Kammer wurde eine Sättigung erreicht. Die Kammer wurde nach 30 Min. zur

⁺Herrn Dr. Wendt und der analytischen Abteilung der Firma Hoffmann-La Roche in Basel danke ich herzlich für die Aufnahme des Spektrums des Metaboliten XIII₇ und für die Hilfe bei der Aufklärung der Struktur.

⁺⁺Herrn Roth (Org.Chem.Inst.FU Berlin) danke ich sehr für die Anfertigung und Interpretation der Spektren.

Trennung von Substanzen herangezogen. Die DC-Platten wurden in den meisten Fällen bis zu ihrer oberen Kante entwickelt, wodurch eine maximale Fließhöhe von 19 cm erreicht wurde. Alle angegebenen Rf-Werte errechnen sich aus mindestens sechs Messungen, die jeweils in neuen Fließmittelansätzen vorgenommen wurden.

II Chemikalien und Lösungen

Die zu den Inkubationen benötigten Enzyme wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. Weitere Zusätze zur Mischung, wie KCl, $MgCl_2$ und Puffersubstanzen waren analysenrein. Der zur Extraktion der Inkubationsansätze verwendete Äther wurde durch Behandeln mit KOH von Peroxid befreit (122). Das verwendete bidestillierte Wasser wurde durch doppelte Destillation von demineralisiertem Wasser in einer Quarzapparatur der Firma Heraeus hergestellt.

III Methoden

1. Dünnschichtchromatographische Trennung von Modellsubstanzen

Um eine ausreichende Trennung der Metaboliten zu erreichen, wurden die Substanzen IV, V, VI, X, XI, XII, XIII, XX und XXI als Modellsubstanzen für die zu erwartenden Metaboliten aus den Inkubationen in verschiedenen Fließmitteln chromatographiert.

Dabei wurden die folgenden Fließmittelsysteme verwendet:

Fließmittel	Zusammensetzung der Mischung	
1	Toluol:Aceton:konz.NH ₃	50:50:1
2	Benzol:Äthylacetat	5:1
3	Chloroform:Aceton:Äthanol	8:1:1
4	Benzol:Äthanol	5:1
5	Benzol:Äthylacetat	1:1
6	Benzol:Äthylacetat:Äthanol	6:3:1
7	Chloroform:Aceton:Äthanol: konz.AcOH	8:1:1:0,5
8	Cyclohexan:Aceton:Äthanol	6:3:1
9	Benzol:Äthylacetat:Äthanol	8:1:1
10	Chloroform:Äthanol:konz.AcOH	95:5:0,5
11	Chloroform:Propanol:konz.AcOH	95:5:0,5
12	Chloroform:Äthanol:konz.HCOOH	95:1:0,5

Die Tabelle 17 faßt die gemessenen Rf-Werte der Modells-
stanzen zusammen.

Fließ- mittel	Rf-Werte der Substanzen								
	IV	V	VI	X	XI	XII	XIII	XX	XXI
1	0,64	0,49	0,24	0,38	0,58	0,68	0,55	0,54	0,74
2	0,14	0,02	0,04	0,03	0,03	0,13	0,04	0,04	0,04
3	0,78	0,67	0,53	0,67	0,78	0,81	0,73	0,77	0,72
4	0,51	0,44	0,34	0,44	0,50	0,55	0,49	0,49	0,47
5	0,35	0,18	0,12	0,15	0,26	0,47	0,35	0,36	0,27
6	0,51	0,43	0,30	0,38	0,44	0,56	0,52	0,48	0,45
7	0,57	0,48	0,35	0,45	0,57	0,60	0,53	0,57	0,53
8	0,47	0,45	0,28	0,34	0,38	0,48	0,47	0,43	0,38
9	0,50	0,43	0,30	0,44	0,48	0,56	0,57	0,48	0,45
10	0,46	0,31	0,19	0,28	0,48	0,54	0,50	0,52	0,42
11	0,44	0,32	0,19	0,26	0,42	0,51	0,38	0,46	0,41
12	0,24	0,11	0,05	0,10	0,24	0,33	0,16	0,25	0,20

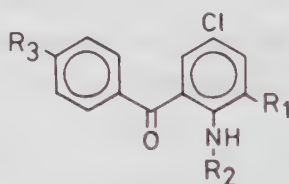
Tabelle 17

Die Tabelle 17 zeigt, daß im Fließmittel 10 eine günstige Auftrennung der Substanzen erfolgte. Von besonderer Wichtigkeit war die Auftrennung von XII und XX und von IV, V, VI und XXI, da XX als Metabolit von XII und VI, V und XXI als Metaboliten des Diazepam (IV) in Betracht kamen.

2. Dünnschichtchromatographische Trennung der Benzophenone

Da sich die in Tabelle 17 aufgeführten Fließmittel für eine Trennung von Benzophenonen als unzureichend erwiesen, mußten neue Fließmittelsysteme zusammengestellt werden. Die folgenden 5 Benzophenone, die nach einer sauren Hydrolyse der Metaboliten entstehen konnten, waren aufzutrennen.

Benzophenon	R ₁	R ₂	R ₃
I	H	CH ₃	H
II	H	H	H
III	H	CH ₃	OH
IV	H	H	OH
V	OH	H	H



Die Benzophenone I-V wurden in den folgenden Fließmitteln chromatographiert:

Fließmittel	Zusammensetzung der Mischung	
13	n-Heptan:Chloroform:Äthanol	5:5:2
14	Chloroform:Äthanol:Aceton	8:1:1
15	Äthylacetat:Äthanol:konz.NH ₃	5:5:1
16	n-Heptan:Chloroform:Äthanol	7:3:2
17	n-Heptan:Chloroform:Äthanol	10:10:1
18	n-Heptan:Äthylacetat:Äthanol: konz. NH ₃	5:5:1:0,3

Die enthaltenen Rf-Werte sind in Tabelle 18 zusammengefaßt. In Fließmittel 17 erfolgte eine ausreichende Auftrennung, die sich durch doppeltes Chromatographieren im gleichen Fließmittel weiter verbessern ließ.

Fließmittel	Benzophenon				
	I	II	III	IV	V
10	0,66	0,60	0,42	---	0,53
13	0,57	0,51	0,52	0,43	0,54
14	0,64	0,61	0,55	0,52	0,57
15	0,76	0,75	0,59	0,56	0,56
16	0,57	0,48	0,45	0,38	0,45
17	0,62	0,45	0,20	0,14	0,24
18	0,66	0,59	0,26	0,20	0,22

Tab. 18: Rf-Werte substituierter Benzophenone nach einmaliger Chromatographie

1. Dünnschichtchromatographische Isolierung und Aufreinigung der Metaboliten

Metaboliten, deren MS-, IR- oder NMR-Spektren angefertigt werden sollten, wurden nach folgendem Schema aufgearbeitet: Die zu isolierenden Metabolitenbanden wurden unter UV-Lampe markiert, anschließend von der DC-Platte abgeschabt, das Kieselgel fein zerrieben und 3 - 5 mal mit reichlich warmem Methanol "spectrograde" extrahiert. Die vereinigten Methanolauszüge wurden filtriert und im Vakuum bis auf wenige Tropfen eingedampft. Dieses Konzentrat wurde auf eine weitere DC-Platte aufgetragen und in einem anderen Fließmittel entwickelt, um Verunreinigungen aus der Inkubation zu entfernen. Der auf diese Weise aufgereinigte Metabolit wurde wieder

abgekratzt, extrahiert und der Extrakt bis auf wenige Tropfen eingedampft.

Zur Reinigung der unteren Hälften der DC-Platten von Weichmachern (z.B. Phthalsäureester) wurden die für die weiteren Untersuchungen benötigten Platten 3 - 4 mal in einem Fließmittelgemisch von Methanol-Äthylacetat 1:1 in gleicher Fließmittelrichtung chromatographiert. Die so gereinigten Platten wurden um 90° gedreht. Das Metabolitenkonzentrat wurde von neuem auf möglichst kleiner Fläche auf die gereinigte Hälfte aufgetragen und mit einem Fließmittel chromatographiert, in dem der Metabolit einen möglichst kleinen Rf-Wert besaß. Das den Metaboliten enthaltende Kieselgel wurde abgeschabt, zerrieben und in eine Mikrofritte D3 gegeben, die zuvor dreimal mit Methanol "spectrograde" und dreimal mit Methylenchlorid p.A. gewaschen worden war. Mit einem Gemisch von insgesamt 5 - 10 ml Methanol "spectrograde" und Methylenchlorid p.A. 1:1, das in drei Anteile getrennt war, wurde das Kieselgel extrahiert. Die entstandene Lösung wurde im Vakuumexsiccator abgezogen. Um unvermeidbar mitfiliertes Kieselgel zu entfernen, wurde die Probe nochmals mit wenig Chloroform "Uvasol" in ein weiteres Gläschen übernommen. Das Chloroform verdampfte anschließend im Vakuumexsiccator. Aus den so erhaltenen Proben wurden die gewünschten Spektren angefertigt. Eine sofortige Aufarbeitung der Probe auf bereits vorbehandelten DC-Platten erwies sich als ungeeignet, da durch das Waschen mit Methanol und Äthylacetat der Trenneffekt der Platte nachließ und keine genügende Aufreinigung der Metaboliten erfolgte.

4. Auswertung der DC-Scans

Die quantitative Bestimmung von Substanzen kann mit Hilfe der UV-Absorption vorgenommen werden. Dazu werden die Absorptionsmaxima der Substanz festgestellt. Die quantitative Bestimmung erfolgt bei der Wellenlänge des Maximums (82).

Zur Bestimmung der geeigneten Wellenlänge zur quantitativen Messung verschiedenartig substituierter 1,4-Benzodiazepine wurden UV-Spektren in Methanol aufgenommen.

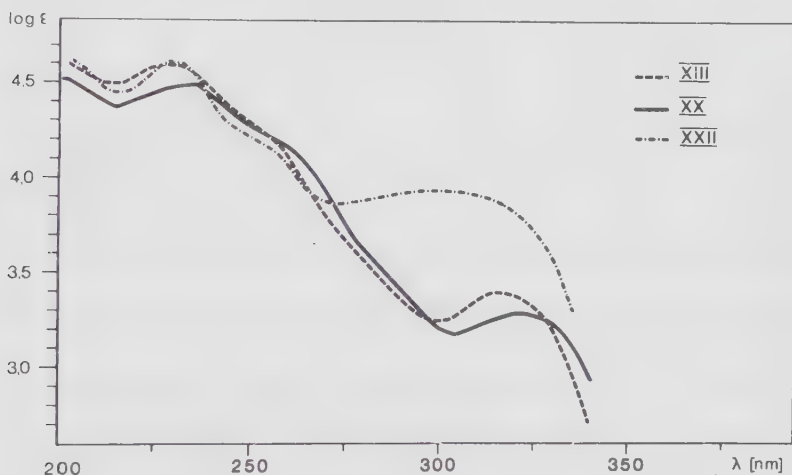


Abb. 65: UV-Absorption von XIII, XX und XXII in Methanol

Aus dem Kurvenverlauf der Substanzen ist ersichtlich, daß eine 3-OH-3-CH₃- oder eine 3-CH₂- und p-OH-Gruppe am 5-Phenylring bzw. eine N-1-Substitution Einfluß auf die Maxima der Substanzen haben. Die molaren Extinktionskoeffizienten differieren ebenfalls.

Substanz	$\lambda_{\max} / \log \epsilon$	$\lambda_{\max} / \log \epsilon$	$\lambda_{\max} / \log \epsilon$
XIII	---	228 / 4,59	315 / 3,40
XX	202 / 4,51	234 / 4,49	325 / 3,28
XXII	202 / 4,60	230 / 4,60	300 / 3,94

Tab. 19: UV-Absorption unterschiedlich substituierter
1,4-Benzodiazepin-2-one

Bei der Messung der UV-Absorption dünn-schichtchromatographisch aufgetrennter Substanzgemische mit unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten und Absorptionsmaxima müssen Eichkurven für die unterschiedlichen Substanzen erstellt werden. Die Eichkurven wurden einheitlich bei 320 nm angelegt, weil die Substanzen in diesem Wellenlängenbereich bereits Maxima besaßen und hier keine störenden Verunreinigungen aus der Inkubationsmischung erfaßt wurden. Diese Eichkurven gleichen den Messfehler der differierenden Wellenlängen der Maxima und die bei der Direktmessung auf der DC-Platte möglichen Verschiebungen der Absorptionsmaxima (123) aus. Zum Anlegen der Eichkurven wurden steigende Substanzkonzentrationen punktförmig auf DC-Platten aufgetragen. Die Platten wurden im gleichen Fließmittel (Fl 10) entwickelt, das auch zur späteren Trennung der Metabolitengemische diente. Anschließend wurden die UV-Absorptionen der verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Die daraus resultierenden Flächen sind der Substanzmenge in bestimmten Messbereichen direkt proportional. Die Mittelwerte aus mindestens vier unabhängigen Messungen ergaben die jeweilige Eichkurve.

Die folgenden Abbildungen 66 und 67 zeigen die Eichkurven der Substrate und Hauptmetaboliten bei 320 nm.

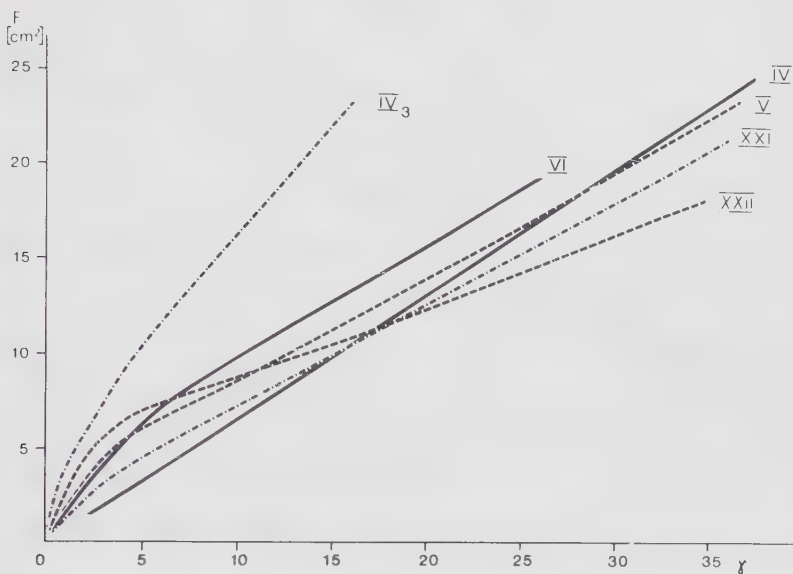


Abb. 66: Eichkurven der Diazepam-Metaboliten bei 320 nm

Die geringere Steigerung der Eichgeraden von XXII im Vergleich zu IV_3 und $XIII_2$ ist auf das unterschiedliche dünn-schichtchromatographische Verhalten von XXII zurückzuführen.

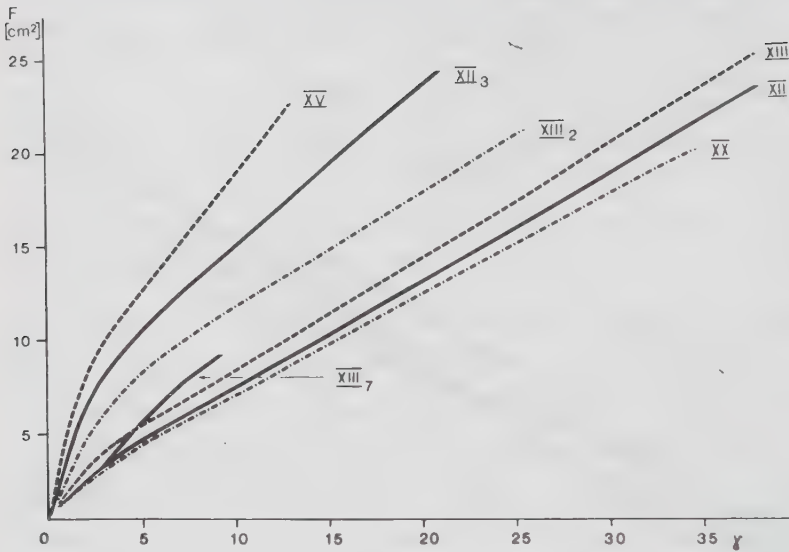


Abb. 67: Eichkurven der Metaboliten von XII und XIII

Die Abschnitte der fast gradlinigen Kurvenverläufe wurden statistisch ausgewertet (124). Die Berechnung der Substanzkonzentrationen führte zu einer Erhöhung der Methodengenauigkeit.

Aus den Wertepaaren der aufgetragenen Substanzmenge (x) und der Fläche unter der Absorptionskurve (y) wurde nach der Methode der kleinsten Quadrate eine Ausgleichsgerade ermittelt. Die Gleichung der linearen Funktion lautet:

$$y = a + bx \quad x = \frac{y - a}{b}$$

Der Wert a ist der Schnittpunkt der Geraden mit der y -Achse und b die Steigerung der Geraden, x gibt die gesuchte Sub-

stanzmenge an. n ist die Anzahl der Wertepaare.

Den Wert a erhält man nach der Formel:

$$a_{yx} = \frac{\sum y - b_{xy} \sum x}{n}$$

b berechnet sich nach:

$$b_{xy} = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Die Schätzung der Regressionsgeraden ergab für die nachstehenden Substanzen folgende Faktoren:

Faktor	IV ₃	V	XII	XIII	XX	XXI
a	5,0	5,63	3,36	3,5	1,52	1,35
b	1,04	0,38	0,43	0,47	0,53	0,54

5. Hydrolysebedingungen von XII, XIII und XX

Das Verhalten des Diazepam und seiner Metaboliten gegenüber Mineralsäuren ist bekannt. Die Spaltung mit 6 n HCl von Diazepam-Metaboliten im siedenden Wasserbad (60 Min.) führt quantitativ zu den entsprechenden Benzophenonen, die unter anderem zur Charakterisierung der enzymatischen Reaktion herangezogen werden (44, 45).

Der Versuch, die gleichen Hydrolysebedingungen auf die 3-Methyl-Analogen des Diazepam (XII und XIII) anzuwenden, mißlang. Es entstanden nur sehr geringe Mengen der Benzophenone. Um zu höheren Ausbeuten von Benzophenonen zu gelangen, wurde versucht, die Substanzen XII und XIII unter verschiedenen Bedingungen zu hydrolisieren. Die Tabelle 20

gibt eine Aufstellung der Bedingungen und die Ausbeuten der gebildeten Benzophenone nach 60 Min. Hydrolyse im siedenden Wasserbad an.

Hydrolysebedingung	Substanz		
	XII	XIII	XX
HClO ₄ 70 %	10 %	20 %	80 %
konz. HCl - AcOH 1:2	50 %	20 %	80 %
konz. HCl	30 %	30 %	100 %
2n KOH - MeOH 1:1	60 %	10 %	10 %
3n KOH - AeOH 1:1	40 %	10 %	20 %
6n KOH - AeOH 1:1	50 %	10 %	20 %

Tab. 20: Ausbeuten an Benzophenonen nach der Hydrolyse von XII, XIII und XX

Die aufgeführten Zahlen stellen Näherungswerte aus dem dünn-schichtchromatographischen Mengenvergleich der nicht umgesetzten Ausgangssubstanz und dem gebildeten Benzophenon dar.

Das Benzodiazepin XX wurde in allen sauren Hydrolysemedien fast quantitativ zum Benzophenon I gespalten. Die Verwendung eines aklalischen Milieus war ungeeignet, da sich hier zahlreiche unerwünschte stark fluoreszierende Substanzen bildeten, aber nur wenig Benzophenon entstand. Eine alkalische Hydrolyse von XII zeigte eine ausreichende Benzophenon-Bildung. Der Anteil fluoreszierender Verbindungen war bedeutend geringer als bei XX. Bei der sauren Hydrolyse von XII in konz. HCl konnte nur relativ wenig Benzophenon erhalten werden. Durch das Fehlen der N-1-CH₃-Gruppe von XIII gegenüber XII war höchstwahrscheinlich der Heterocyclus von XIII gegenüber

Säuren so stark stabilisiert worden, daß keine der verwendeten Hydrolysebedingungen zufriedenstellende Ausbeuten von Benzophenon ergab.

Da die saure Hydrolyse mit konz. HCl ohne nennenswerte Bildung von Nebenprodukten verlief, wurde diese Hydrolyseart zur Spaltung aller Metaboliten gewählt. Durch Anlösen der Substanzen in wenigen Tropfen Methanol und durch Verlängerung der Hydrolysedauer auf 3 Stunden konnten die Ausbeuten an Benzophenonen verdoppelt werden.

6. Hydrolyse der Substrate und Metaboliten

Die Hydrolyse der Substrate und Metaboliten zu Benzophenonen wurde in ca. 3 ml konz. HCl 3 Stunden lang im siedenden Wasserbad vorgenommen. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde mit Wasser auf ca. 15 - 20 ml verdünnt und mit NaHCO_3 neutralisiert. Anschließend wurde 3 mal mit je 15 ml Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherauszüge wurden mit ca. 50 ml Wasser gewaschen, die Ätherphase mit Natriumsulfat getrocknet und der Äther im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig Methanol aufgenommen und dünnschichtchromatographisch mit bekannten Benzophenonen in Fl 17 verglichen.

7. Aufarbeitung der Rattenleber zur Gewinnung induzierter Mikrosomen

Einer männlichen, ca. 150 g schweren Ratte mittleren Alters (Ratte Sprague Dawley - Albinos, steril aufgezogen) wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 80 mg Phenobarbital / kg Körpergewicht interperitoneal injiziert. Anschließend wurde

sie 24 Std. nüchtern gehalten und durch Dekapitieren getötet. Nach dem Ausbluten des Tieres wurde die Leber entfernt.

Zur Perfusion der Leber wurden sofort 10 ml eisgekühlte physiologische Kochsalzlösung zugegeben, die anschließend verworfen wurden. Dann wurde das 9-fache des Lebergewichts an 0,25 M Saccharoselösung hinzugefügt, die Leber zerschnitten und eiskalt homogenisiert. Die entstandene Lebersuspension wurde in einer Sorval-Zentrifuge (Rotor Typ SS-34) 10 Min. lang mit 1 200 x g zentrifugiert. Der entstandene Bodensatz wurde verworfen. Der Überstand wurde nochmals 20 Min. lang mit 19 000 x g zentrifugiert. Der neu entstandene Mikrosomenüberstand wurde zur Inkubation verwendet.

Mikrosomensuspensionen von nicht induzierten Kontrolltieren wurden analog hergestellt.

Die auf diese Weise hergestellten Mikrosomensuspensionen zeigten nach 30 Tagen Lagerung bei -24°C keinen meßbaren Aktivitätsverlust.

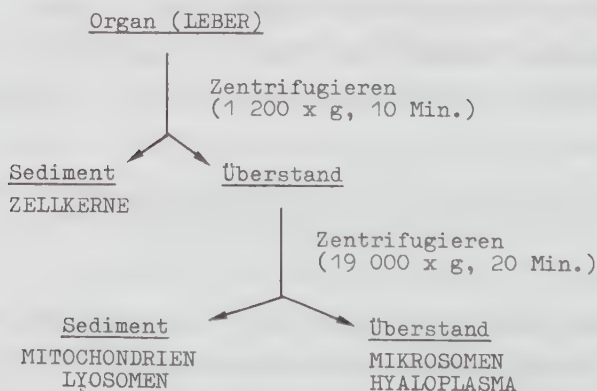


Abb. 68: Schema der Mikrosomengewinnung durch differentielle Zentrifugation

8. Inkubationsmischung und Inkubationsbedingungen

Die folgende bewährte Mischung (91) wurde zur Inkubation jeweils frisch hergestellt:

- | | | |
|----|--------------|---------------------------|
| 1) | 2 ml 0,01 M | ATPNa ₂ - Lsg. |
| 2) | 1 ml 0,003 M | NADP - Lsg. |
| 3) | 1 ml 0,003 M | NAD - Lsg. |
| 4) | 1 ml 0,6 M | Nicotinamid - Lsg. |
| 5) | 2 ml 0,03 M | Glucose-6-Phosphat-Lsg. |
| 6) | 1 ml 0,1 M | MgCl ₂ - Lsg. |
| 7) | 1 ml 2 M | KCl - Lsg. |
| 8) | 10 ml 0,1 M | Phosphatpuffer pH 7,4 |
| 9) | 3 ml | Mikrosomensuspension |

1) - 5) wurden in Substanz abgewogen und in 7 ml Aq. bidest. gelöst. Von 6) - 8) waren Stammlösungen vorrätig, die im Kühlschrank aufbewahrt wurden. Bei Inkubationen von IV, XII oder XIII wurden die Substanzen in wenigen Tropfen 1 n HCl angelöst und mit Aq. bidest. auf 8 ml aufgefüllt. Diese Lösungen wurden zur Inkubationsmischung zugegeben. Alle anderen säurelabilen Substrate wie XIV, XX oder XXXI wurden in wenigen Tropfen Methanol gelöst und ebenfalls zu 8 ml mit Aq. bidest. aufgefüllt. Die Verwendung von Methanol war geeignet, da analog behandeltes XII kein verändertes Metabolitenschema durch Beeinflussung der Mikrosomen ergab.

Die vollständige Inkubationsmischung wurde 60 Min. lang unter Luftzutritt und ständigem Schütteln im Wasserbad bei 37°C belassen. Um die Inkubation vergleichen zu können,

wurden jeweils äquimolare Mengen Substrat, gleiche Mengen mit Phenobarbital induzierte oder nicht induzierte Rattenlebermikrosomen eingesetzt und gleiche Inkubationszeiten eingehalten.

Bei Versuchen zur Hemmung der Enzymaktivität mit Metyrapon betrug die Konzentration des Hemmstoffs in der Inkubationsmischung 10^{-4} M. Der Hemmstoff wurde vor Zugabe der Mikrosomen zur Inkubationsmischung hinzugefügt.

Sollten quantitative Vergleiche der gebildeten Metaboliten vorgenommen werden, wurden frisch bereitete Mikrosomen suspensionen verwendet. Bei Inkubationen zum qualitativen Nachweis und zur Strukturanalyse der Metaboliten wurde auf überschüssiges Mikrosomenmaterial aus der Tiefkühltruhe zurückgegriffen.

Alle zur Inkubation benötigten Lösungen wurden mit Aq. bidest. hergestellt. Der Kaliumphosphatpuffer wurde elektrometrisch mit KOH auf pH 7,4 eingestellt.

9. Aufarbeitung des Inkubationsansatzes

Die Inkubationsmischung wurde sofort nach Ablauf der Inkubationszeit in noch warmem Zustand dreimal mit einer Äthermenge extrahiert, deren Gesamtmenge dem Inkubationsvolumen entsprach. Die vereinigten Ätherauszüge wurden mit dem halben Volumen Wasser gewaschen und die Ätherphase mit wenig Natriumsulfat getrocknet. Der Äther wurde im Vakuum abgedampft und der Rückstand in Äther aufgenommen. Die Lösung mit den darin enthaltenen Metaboliten wurde auf DC-Platten aufgetragen und in Fl 10 entwickelt.

Die Extraktion eines Inkubationsansatzes mit Mikrosomen ohne Substrat (Blindwert), der in Fl 10 entwickelt wurde, führte zu vier Substanzflecken. Da die Rf-Werte aber größer als die der Metaboliten waren, kam es zu keiner Störung der quantitativen Auswertung der Metabolitenanteile. Das ebenfalls extrahierte Nicotinamid (Rf=0,02) zeigte bei 320 nm keine Absorption.

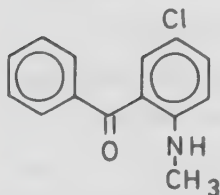
Anschließende Extraktionen der Inkubationsmischung bei pH 3-4 und pH 9 ließen nach dem Chromatographieren keine weiteren Metaboliten auf der DC-Platte sichtbar werden.

10. Reaktion nach Bratton-Marshall mit Hydrolyse

Die DC-Platten mit aufgetrennten Inkubaten wurden mit 2 n H_2SO_4 besprüht und im Trockenschrank 15 Min. auf 130°C erhitzt. Anschließend wurden die Platten in einer trockenen Kammer 5 Min. lang NO-Gasen ausgesetzt (zu einigen Gramm NaNO_2 in einem Schälchen 10 ml 2 n H_2SO_4 geben) und die Gase im kalten Luftstrom verblasen. Nach dem Besprühen der Platten mit einer 0,4 %igen wässrigen Lösung des Kupplungsreagenzes (N(1-(Naphthyl)-äthylen-diammoniumdichlorid) entstanden bei unsubstituierten aromatischen Aminen rosa bis braune Färbungen, die sofort betrachtet wurden.

IV Synthesen der Substrate und Metaboliten

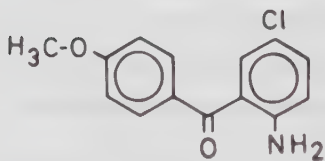
5-Chlor-2-methylamino-benzophenon (Benzophenon I)



0,2 g Diazepam wurden mit 20 ml 6 n HCl 60 Min. unter Rückfluß im siedenden Wasserbad gekocht. Nach Abkühlen der Lösung wurde unter Kühlung mit 6 n NaOH neutralisiert. Aus der schwach alkalischen Lösung wurden die gelben Kristalle abgesaugt und mit reichlich H₂O gewaschen.

Anschließend wurde aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute: 80 % der Theorie, schwach gelbe Kristalle vom Fp. 95 - 96° (125).

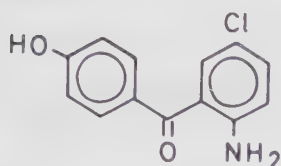
2-Amino-5-chlor-4'-methoxy-benzophenon (Benzophenon IVa) (125-127)



25 g 4-Methoxy-benzoesäurechlorid wurden auf 120° erhitzt und unter Rühren 15 g 4-Chloranilin dazugegeben. Die Mischung wurde auf 180° erhitzt und 11 g wasserfreies ZnCl₂ hinzugefügt. Nach Beendigung der

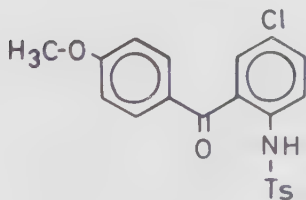
HCl-Entwicklung (ca. 2 Std.) und Abkühlen auf 120° wurde dreimal mit jeweils 50 ml 3 n HCl aufgekocht. Die heiße Säure wurde verworfen und der unlösliche Rückstand in 50 ml 75 % (v./v.) H₂SO₄ gelöst und 40 Min. unter Rückfluß gekocht. Die heiße Lösung wurde auf 500 g Eis gegeben und mehrfach mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten Methylenchloridphasen wurden mit 3 n HCl und anschließend mit 1 n NaOH gewaschen. Das Methylenchlorid wurde getrocknet (Na₂SO₄) und im Vakuum abgedampft. Der Rückstand mit dem rohen Reaktionsprodukt (25 % der Theorie) wurde zur weiteren Synthese eingesetzt.

2-Amino-5-chlor-4'-hydroxy-benzophenon (Benzophenon IV) (126)



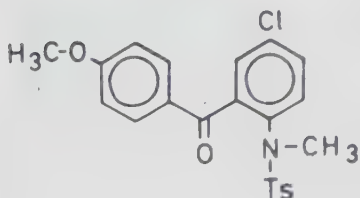
1,3 g rohes Benzophenon IVa wurden 14 Stunden in 70 ml 48 %iger HBr unter Rückfluß gekocht. Die erkaltete Lösung wurde in Wasser gegossen und auf einen schwach sauren pH eingestellt. Nach mehrfacher Extraktion mit Äther wurden die vereinigten Ätherphasen mit 10 %iger NaOH ausgeschüttelt. Die wässrige alkalische Lösung wurde mit H_2SO_4 angesäuert und mit Äther extrahiert. Der Äther wurde im Vakuum abgedampft. Das Umkristallisieren des Rückstandes aus Methanol ergab braun-gelbe Kristalle vom Fp. $170 - 172^\circ$ (40 % der Theorie).

2-Tosylamido-5-chlor-4'-methoxy-benzophenon (Benzophenon IVb) (126)



1,3 g rohes Benzophenon IVa wurden mit 1,2 g 4-Methyl-benzolsulfonsäure-chlorid in 6 ml Pyridin 90 Min. unter Rückfluß gekocht. Die erkaltete Lösung wurde in Wasser gegossen und das abgesetzte Öl mit heißem Wasser und anschließend mit Petroläther (Kp $40 - 60^\circ$) gewaschen. Nach dem Umkristallisieren aus Benzol/Hexan ergab sich eine Ausbeute von 80 % Theorie, schwach gelbe Kristalle vom Fp 124° .

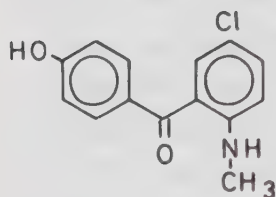
2-Tosylamido-N-methyl-5-chlor-4'-methoxy-benzophenon (Benzophenon IIIa) (126)



1,2 g Benzophenon IV b wurden mit 4 ml 1 n methanolischer Natriummethylatlösung versetzt und bis zur klaren Lösung Methanol hinzugefügt. Der Methanol wurde im Vakuum abgedampft, der Rück-

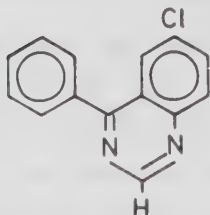
stand in 7 ml Dimethylformamid aufgenommen und 1,5 ml Methyljodid dazugegeben. Nach 60 Min. Stehen bei Raumtemperatur wurde die Hälfte des Lösungsmittels in Vakuum abgedampft und der verbliebene Rest in Wasser gegossen. Das Rohprodukt (70 % der Theorie) wurde zur weiteren Umsetzung herangezogen.

2-Methylamino-5-chlor-4'-hydroxy-benzophenon (Benzophenon III)
(126)



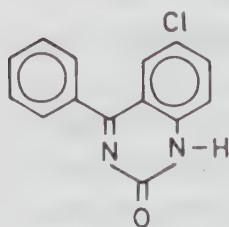
700 mg rohes Benzophenon IIIa wurden wie das Benzophenon IVa mit HBr unter Rückfluß gekocht und analog aufgearbeitet. Ausbeute: 50 % der Theorie, gelbe Kristalle vom Fp. 163 - 164°.

4-Phenyl-6-chlor-chinazolin (XVII) (128)



500 mg käufliches Benzophenon II wurden 45 Min. in einer Mischung aus 1 ml Ameisensäure und 1 ml Formamid unter Rückfluß gekocht. Die Lösung wurde in Wasser gegeben und mit Äther extrahiert. Nach dem Umkristallisieren aus Äthanol/Wasser ergab sich eine Ausbeute von 83 % der Theorie. Farblose Nadeln vom Fp. 138 - 139°.

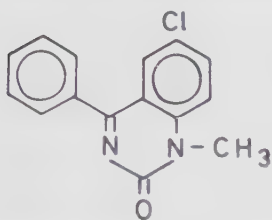
6-Chlor-4-phenyl-(1H)-chinazolin-2-on (XVIII) (129)



3 g Benzophenon II wurden mit 1 g Harnstoff innig verrieben und bei 200° im Paraffinbad bis zum Erstarren der Schmelze erhitzt (ca. 30 Min.). Die erstarrten Massen wurden zerrieben und mit n-Hexan extrahiert (Abtrennung des nicht umgesetzten Benzophenons). Der gelbe Rückstand wurde mit Wasser

gewaschen und aus reichlich Aceton umkristallisiert. Ausbeute: 70 % der Theorie, gelbe Kristalle vom Fp. $320 - 324^{\circ}$ (Lit.: $310 - 312^{\circ}$).

6-Chlor-4-phenyl-1-methyl-chinazolin-2-on (XIX)

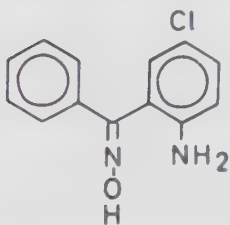


1,3 g XVIII wurden analog XI methyliert und aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde in Aceton aufgenommen und vom noch schlechter löslichen Ausgangsprodukt abfiltriert. Das Aceton wurde abgedampft. Nach dem Umkristallisieren aus Äthanol ergab sich eine Ausbeute von 72 % der Theorie, schwach grün-gelbe Nadeln vom Fp. $219 - 221^{\circ}$ (71).

Molekulargewichtsbest.: Ber.: 270,5

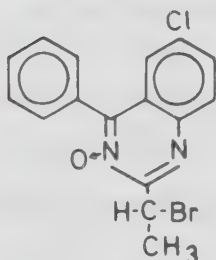
Gef.: 270 (massenspektrometrisch)

2-Amino-5-chlor-benzophenon-oxim (VIII) (130,131)



28 g Benzophenon II und 20 g Hydroxylaminhydrochlorid wurden in 200 ml Pyridin und 600 ml Äthanol 20 Stunden unter Rückfluß gekocht. Die Lösung wurde im Vakuum eingeeengt, mit Wasser und Äther versetzt und anschließend die organische Phase mit Wasser gewaschen. Die Ätherphase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Nach dem Umkristallisieren aus Äthanol ergab sich eine Ausbeute von 63 % der Theorie, schwach gelbe Kristalle vom Fp. $170 - 172^{\circ}$ (α -Oxim), die sich durch Kochen mit Aktivkohle entfärben ließen.

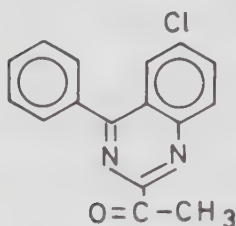
6-Chlor-4-phenyl-2-(α -bromäthyl)-chinazolin-3-oxid (IX) (131)



12,3 g VIII wurden in 90 ml Eisessig und mit 10,8 g α -Brompropionsäurebromid 120 Min. auf 70° erwärmt und nach 20 Stunden Stehen bei Raumtemperatur im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde in Methylenchlorid aufgenommen und mit 1 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die

Methylenchloridphase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum abgedampft. Nach dem Umkristallisieren aus Äthanol wurde eine Ausbeute von 42 % der Theorie erhalten. Gelbe Nadeln vom Fp. 183 - 184°, die nicht weiter gereinigt wurden.

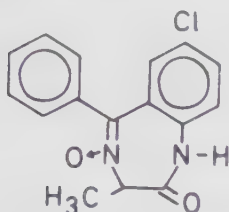
6-Chlor-2-acethyl-chinazolin (XV) (51)



1 g XXIV wurde 120 Min. in 20 ml 6 NaOH gekocht. Nach Abkühlen und Neutralisieren der Lösung wurde mit Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherphasen wurden mit Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat ge-

trocknet. Der Äther wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute: 30 % der Theorie, farblose Kristalle vom Fp. 132 - 134°.

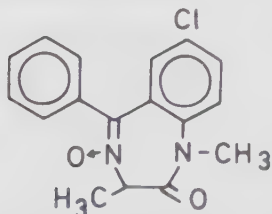
7-Chlor-1,3-dihydro-3-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on-4-oxid (X)



4,7 g IX wurden in 80 ml Äthanol gelöst und 4,8 ml 3 n Natronlauge tropfenweise zugesetzt. Nach einer Stunde Rühren bei 20° wurde Essigsäure bis pH 4-5 zugegeben und mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten

Chloroformphasen wurden zweimal mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, das Chloroform wurde abgedampft. Die entstandenen Kristalle wurden in Äthanol aufgenommen und daraus umkristallisiert. Ausbeute: 33 % der Theorie, farblose Prismen vom Fp. 268° Zers. (69).

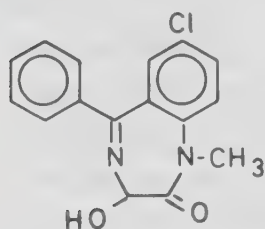
7-Chlor-1,3-dihydro-1,3-dimethyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on-4-oxid (XI)



4,7 g X wurden in 80 ml DMFA gelöst und mit 5,4 ml einer 0,5 M Natriummethylatlösung versetzt. Nach 30 Min. Rühren bei Zimmertemperatur wurden tropfenweise 0,18 ml Methyljodid

zugegeben. Nach 60 Min. Rühren wurde die Lösung in 100 ml Wasser gegossen, mit Methylenchlorid extrahiert und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit Natriumsulfat wurde im Vakuum abgedampft und das zurückbleibende Öl aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. Ausbeute: 46 % der Theorie, weiße Nadeln vom Fp. 185 - 188° (132).

7-Chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (XXI)



1,4 g VI wurden analog XI methyliert und aufgearbeitet. Ausbeute: 65 % der Theorie, weißes Pulver vom Fp. 117° (Cyclohexan).

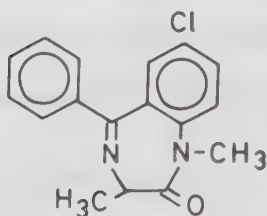
Molekulargewichtsbest: Ber.: 300,5

Gef.: 300

(massenspektrometrisch)

7-Chlor-1,3-dimethyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (XII)

(analog 133)



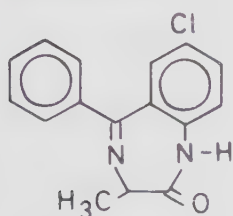
175 mg XI wurden in 8 ml wasserfreiem Chloroform gelöst und mit 0,26 ml Phosphortrichlorid 30 Min. unter Rückfluß gekocht. Die Lösung wurde nach Erkalten in Eiswasser gegossen, mit Natronlauge alkalisch gemacht und mit Methyl-

chlorid extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen und das Methylenchlorid abgedampft. Das entstandene Öl wurde in heißem Äthanol aufgenommen. Die heiße Lösung wurde bis zur schwachen Trübung mit Wasser versetzt. Beim Erkalten bei Zimmertemperatur schieden sich rhombische Kristalle vom Fp. 91 - 93° ab. Ausbeute: 80 % der Theorie.

Molekulargewichtsbest.: Ber.: 298,5

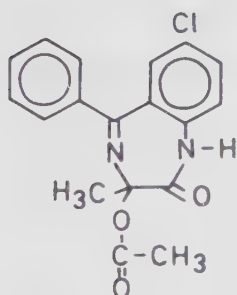
Gef.: 298 (massenspektrometrisch)

7-Chlor-3-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (XIII)
(analog 133)



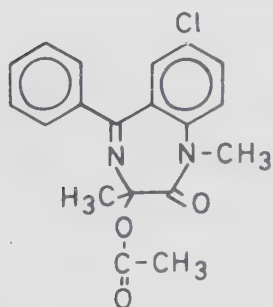
0,4 g X wurden analog XII reduziert.
Nach dem Umkristallisieren aus Äthanol
ergab sich eine Ausbeute von 48 % der
Theorie, schwach grün-gelbes Pulver
vom Fp. 220 - 221° (69).

3-Acetoxy-7-chlor-1,3-dihydro-3-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (XXIV) (51)



Zu einer Suspension von 2 g X in 20 ml
Essigsäure wurden unter Rühren 20 ml
Essigsäureanhydrid gegeben. Die Lösung
wurde 15 Min. im siedenden Wasserbad
unter Rückfluß gekocht. Nach dem Ab-
dampfen im Vakuum und Umkristalli-
sieren aus Äthanol wurde eine Ausbeute
von 40 % der Theorie erhalten. Schwach
gelbe Kristalle vom Fp. 179 - 180°.

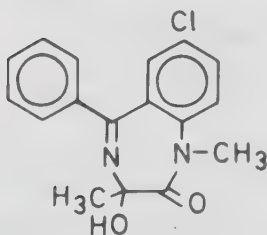
3-Acetoxy-7-chlor-1,3-dihydro-1,3-dimethyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (XXVI) (134)



Eine Mischung aus 2 g XI, 25 ml
Toluol und 13 ml Essigsäureanhydrid
wurde 3 Stunden unter Rückfluß ge-
kocht. Während dieser Zeit konnten
ca. 80 % des Toluols entweichen.
Die verbliebene Lösung wurde im
Vakuum abgedampft und der Rück-
stand aus Methylenchlorid/Hexan

umkristallisiert. Ausbeute: 45 % der Theorie, weißes Pulver vom Fp. 148 - 150°.

7-Chlor-1,3-dihydro-1,3-dimethyl-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (XX) (134)



500 mg XXVI wurden bei Raumtemperatur in 6 ml konz. H_2SO_4 gelöst und anschließend sofort in Eis gegossen und mit Ammoniak alkalisch gemacht. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Nach dem Umkristallisieren aus Methylenchlorid/

Hexan ergab sich eine Ausbeute von 52 % der Theorie, weiße Kristalle vom Fp. 156 - 158° Zers.

F Zusammenfassung
=====

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte:

Im ersten Abschnitt wird die Identifizierung der durch Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen gebildeten Metaboliten des Diazepam (IV) und seiner 3-Methylanaloge XII und XIII beschrieben. Dabei werden Metaboliten unterschieden, die entweder durch oxidative Mechanismen oder durch Umlagerungen des Diazepinringes gebildet werden.

Zur Analytik und Strukturaufklärung der Metaboliten wurden die Massenspektrometrie, NMR-Spektroskopie, Spektrophotometrie und der Vergleich mit synthetisierten Verbindungen herangezogen. Auf diese Weise konnte ein vollständiges Spektrum der gebildeten Metaboliten erhalten werden.

Beim Diazepam ließen sich zu den bisher aus der Literatur bekannten Metaboliten zusätzlich zwei durch Umlagerung entstandene Chinazolinon-Metaboliten (XVIII und XIX) identifizieren. Diese Chinazolinone sind vor kurzem unabhängig von dieser Arbeit als Metaboliten des Oxazepam und des Lorazepam identifiziert worden (76, 75) und konnten von uns weiterhin beim Metabolismus der Handelspräparate Medazepam (XIV) und - in erhöhtem Anteil bei - Dikalium-Chlorazepat (XXXI) nachgewiesen werden. Als Vorstufen der enzymatischen Umlagerung zu Chinazolinonen wurden 3-hydroxylierte Benzodiazepin-2-one festgestellt. Da die 3-Methyl-

analogen des Diazepam (XII und XIII) ebenfalls zu einem erheblichen Anteil zu XVIII und XIX metabolisiert wurden, stellt eine Oxidation zu 3-Oxo-Derivaten voraussichtlich keine weitere Zwischenstufe der Ringverengung dar.

NMR-spektroskopische Untersuchungen ergaben, daß die 3-Methylanalogen des Diazepam (XII und XIII) nur in der Konformation mit der 3-Methylgruppe in quasiäquatorialer Lage vorliegen. Dies bewirkte eine Verminderung der 3-Oxygenierung, so daß XII und XIII gegenüber Diazepam (IV) sehr unterschiedlich metabolisiert wurden. Bei XII und XIII ließen sich zusätzlich zwei phenolische Metaboliten nachweisen, die in einer anderen als in der para-Stellung innerhalb des 5-Phenylringes hydroxiliert worden waren. Weiterhin traten bei den 3-Methylanalogen Umlagerungen zu Chinazolin (XV und XIII₇) auf. Die enzymatischen Ringverengungen zu Chinazolin-Derivaten wurden mit chemischen Reaktionen verglichen, die zu analogen Produkten führen. Es wurde die Möglichkeit einer gemeinsamen Vorstufe in Form eines Enzym-Substrat-Komplexes der Chinazolinon- und Chinazolin-Metaboliten diskutiert.

Der zweite Abschnitt der Arbeit beschreibt den Einfluß der Enzyminkuktion durch Phenobarbital und die Inhibierung der mikrosomalen Oxygenierung durch Metyrapon auf den Metabolismus des Diazepam (IV), 3-Methyl-Diazepam (XII), N-1-Nor-3-methyl-Diazepam (XIII) und Medazepam (XIV). Dabei wurde die Hemmwirkung des Metyrapon auf mit Phenobarbital induzierte und nicht induzierte Mikrosomen untersucht. Die

Stoffklasse der 1,4-Benzodiazepine wurde zu diesen Untersuchungen ausgewählt, da hier verschiedene Oxygenierungsreaktionen innerhalb desselben Moleküls beobachtet werden können.

Die Enzyminduktion mit Phenobarbital führte zu einer unterschiedlichen Aktivierung der verschiedenen Metabolisierungsschritte. Es ließ sich feststellen, daß durch die Enzyminduktion die N-1-Demethylierung, 3-Hydroxilierung und die Bildung phenolischer Metaboliten unterschiedlich angeregt werden. Die Induktion wirkte sich ebenfalls auf die Hydroxilierungsrate des C-2 beim Medazepam aus. Sterische Faktoren und die Art der Substitution am N-1 und C-3 waren auch nach der Enzyminduktion für die Metabolisierungsraten von entscheidender Bedeutung.

Die Zugabe des Hemmstoffs Metyrapon zu den Inkubationen bewirkte eine unterschiedliche Beeinflussung der einzelnen Oxygenierungsreaktionen. Die 3-Hydroxilierung wurde stark und die N-1-Demethylierung etwas weniger stark inhibiert. Die aromatische Hydroxilierung dagegen wurde nur wenig oder gar nicht beeinflusst. Die Hemmwirkung des Metyrapon war in jedem Fall bei mit Phenobarbital induzierten Mikrosomen ausgeprägter als bei nicht induzierten Mikrosomen. Da diese Metabolisierungsschritte vermutlich alle durch das Cytochrom P 450 katalysiert werden, ist eine qualitative Veränderung des Cytochrom-Oxygenase-Systems durch die Enzyminduktion mit Phenobarbital wahrscheinlich. Die Ergebnisse werden mit den bisher bekannten Vorstellungen der mikrosomalen Oxygenierung verglichen und diskutiert.

Literaturverzeichnis

=====

- 1) MILNE, M.D., B.H. SRIBNER, M.A. CRAWFORD
Amer. J. Med. 24, 709 (1958)
- 2) REMMER, H.
Der Internist 7, 413 (1966)
- 3) MIETINEN, T.A., E. LESKINEN
Biochem. Pharmacol. 12, 565 (1963)
- 4) BOOTH, J., E. BOYLAND
Biochem. J. 91, 362 (1964)
- 5) UEHLEKE, H.
Biochem. Pharmacol. 12, 219 (1963)
- 6) GILETTE, J.R.
Adv. in Pharmacol. 4, 219 (1966)
- 7) MÜLLER, G.C., J.A. MILLER
J. Biol. Chem. 185, 145 (1950)
- 8) FOUTS, J.R., J.J. KAMM, B.B. BRODIE
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 120, 291 (1957)
- 9) ESTABROOK, R.W., M.R. FRANKLIN, B. COHEN
Metabolism 20, 187 (1971)
- 10) BRODIE, B.B., J.R. GILETTE, B.N. LA DU
Ann. Rev. Biochem. 27, 427 (1958)
- 11) AXELROD, J.
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 114, 430 (1955)
- 12) AXELROD, J.
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 117, 322 (1956)
- 13) OMURA, R., R. SATO, D.Y. COOPER, O. ROSENTHAL, R.W. ESTABROOK
Federation Proc. 24, 1181 (1965)
- 14) ORRENIUS, S., L. ERNSTER
Biochem. Biophys. Res. Commun. 16, 60 (1964)
- 15) COOPER, D.Y., S. LEVIN, S. NARASIMHULU, O. ROSENTHAL
Science 147, 400 (1965)
- 16) KRITCHEOSKY, D., S.A. TEPPER, E. STAPLE, M.W. WHITEHOUSE
J. Lipid. Res. 4, 188 (1963)
- 17) KUNTZMANN, R., M. JACOBSON, K. SCHNEIDMAN, A.H. CONNEY
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 146, 280 (1964)
- 18) RIETBROCK, N., U. ABSHAGEN
Dtsch. med. Wschr. (im Druck)

- 19) CONNEY, A.H., G. DAVISON, R. GASTEL, J.J. BURNS
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 130, 1 (1960)
- 20) CONNEY, A.H., E.C. MILLER, J.A. MILLER
Cancer Res. 16, 450 (1956)
- 21) KNOWLES, J.A., H.W. RUELIUS
Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.) 22, 687 (1972)
- 22) RIEDER, J., G. RENTSCH
Arzneimittel-Forsch. 18, 1545 (1968)
- 23) STERNBACH, L.H., E. REEDER
J. Org. Chem. 26, 1111 (1961)
- 24) HUMMEL, P., A. PLETSCHER
Praxis (Schweiz) 53, 1366 (1964)
- 25) WALKENSTEIN, S.S., R. WISER, C.H. GUDMUNDSEN, H.B. KIMMEL,
R.A. CORRADINO
J. Pharm. Sci. 53, 1181 (1964)
- 26) SVENSON, S.E., L.E. GORDON
Current Therap. Res. 7, 367 (1965)
- 27) RANDALL, L.E., W. SCHALLEK, R.E. BAGDON, J. RIEDER
Med. Wschr. (Schweiz) 92, 334 (1965)
- 28) RANDALL, L.O., C. SCHECKEL, W. POOL
Arch. int. Pharmacodyn. 185, 135 (1970)
- 29) RANDALL, L.O., W. SCHALLEK, C. SCHECKEL, R. BANZIGER,
R.A. MOE
Arzneimittel-Forsch. 18, 1542 (1968)
- 30) SCHOPBACH, R.R.
Internat. J. Neuropsychiatry 3, 494 (1967)
- 31) RANDALL, L.E., W. SCHALLEK, C.L. SCHECKEL, P.L. STEFKO,
R.F. BANZIGER, W. POOL, R.A. MOE
Arch. int. Pharmacodyn. 178, 216 (1969)
- 32) JICK, H.
Current Therap. Res. 9, 355 (1967)
- 33) HARTMANN, E.
Psychopharmakologica 12, 346 (1968)
- 34) KOECHLIN, B.A., L. D'ARCONTE
Analytical Biochemistry 5, 195 (1963)
- 35) KOECHLIN, B.A., M.A. SCHWARTZ, G. KROL, W. OBERHANSLI
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 148, 399 (1965)

- 36) SCHWARTZ, M.A., E. POSTMA
J. Pharmacol. Sci. 55, 1358 (1966)
- 37) SCHWARTZ, M.A., E. POSTMA, Z. GAUT
J. Pharmacol. Sci. 60, 1500 (1971)
- 38) SCHWARTZ, M.A., E. POSTMA, S.J. KOLIS
J. Pharmacol. Sci. 60, 438 (1971)
- 39) SCHWARTZ, M.A., F.M. VANE, E. POSTMA
Biochem. Pharmacol. 17, 965 (1968)
- 40) KOECHLIN, B.A., M. A. SCHWARTZ
Fed. Proc. 20, 171 (1961)
- 41) VAN D. KLEIJN, E.
Arch. int. Pharmacodyn. 179, 225 (1969)
- 42) SADÉE, W., W. GARLAND, N. CASTAGNOLI
J. Med. Chem. 14, 643 (1971)
- 43) SCHWARTZ, M.A., B.A. KOECHLIN, G. KROL
Fed. Proc. 22, 367 (1963)
- 44) DE SILVA, J.A.F., B.A. KOECHLIN, G. BADER
J. Pharmacol. Sci. 55, 692 (1966)
- 45) DE SILVA, J.A.F., M.A. SCHWARTZ, V. STEFANOVIC, J. KAPLAN,
L.D'ARCONTE
Analytical Chem. 36, 2099 (1964)
- 46) VAN D. KLEIJN, E., J.M. VAN ROSSUM, E.T.J.M. MUSKENS,
N.V.M. RIJNTJES
Acta Pharm. 29, 109 (1971)
- 47) SCHWARTZ, D.E., M. VECCHI, A. RONCO, K. KAISER
Arzneimittel-Forsch. 16, 1109 (1966)
- 48) SCHWARTZ, M.A., B.A. KOECHLIN, E. POSTMA, S.H. PALMER,
G. KROL
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 149, 423 (1965)
- 49) DE SILVA, J.A.F., L. D'ARCONTE, J. KAPLAN
Current Therap. Res. 6, 115 (1964)
- 50) MARCUCCI, F., E. MUSSINI, A. GUAITANI, R. FANELLI,
S. GARATTINI
Europ. J. Pharmacol. 16, 311 (1971)
- 51) BELL, S.C., R.J. MC.CAULLY, C. GOCHMAN, S.J. CHILDRESS,
M.I. GLUCKMAN
J. Med. Chem. 11, 457 (1968)
- 52) STERNBACH, L.H., L.O. RANDALL, S. GUSTAFSON
Medical Research Series Vol. 2, "Drugs Affecting the
Central Nervous System". A. Burger, Ed., M. Dekker Inc.,
New York, 1968

- 53) STERNBACH, L.H., R.I. FREYER, W. METLESICS, E. REEDER,
G. SACH, G. SAUCY, A. STEMPEL
J. Org. Chem. 27, 3788 (1962)
- 54) DE SILVA, J.A.F., J. KAPLAN
J. Pharm. Sci. 55, 1278 (1966)
- 55) CHILDRESS, S.J., M.I. GLUCKMAN
J. Pharm. Sci. 53, 577 (1964)
- 56) STERNBACH, L.H.
Persönliche Mitteilung
- 57) BARTOŠEK, I., J. KŮVĚTINA, A. GUAITANI, S. GARATTINI
Europ. J. Pharmacol. 11, 378 (1970)
- 58) BEYER, K.-H., W. SADÉE
Arzneimittel-Forsch. 19, 1929 (1969)
- 59) DI CARLO, F.J., J.P. VIAU, J.E. EPPS, L.J. HAYNES
Clin. Pharmacol. Therap. 11, 890 (1970)
- 60) KIMMEL, H.B., S. WALKENSTEIN
J. Pharm. Sci. 56, 538 (1967)
- 61) MARCUCCI, F., R. FANELLI, E. MUSSINI, S. GARATTINI
Europ. J. Pharmacol. 9, 253 (1970)
- 62) SCHWARTZ, M.A., J.J. CARBONE
Biochem. Pharmacol. 19, 343 (1970)
- 63) SCHWARTZ, M.A., E. POSTMA
J. Pharm. Sci. 59, 1800 (1970)
- 64) SCHWARTZ, M.A., F.M. VANE, E. POSTMA
J. Med. Chem. 11, 770 (1968)
- 65) MARCUCCI, F., E. MUSSINI, R. FANELLI, S. GARATTINI
Biochem. Pharmacol. 19, 1847 (1970)
- 66) PELZER, H., D. MAASS
Arzneimittel-Forsch. 19, 1652 (1969)
- 67) ARCHER, G.A., L.H. STERNBACH
Chemicals Reviews 68, 747 (1968)
- 68) STERNBACH, L.H.
Angew. Chem. 83, 70 (1971)
- 69) BELL, S.C., R.J. MC. CAULLY, S.J. CHILDRESS
J. Org. Chem. 33, 216 (1968)
- 70) BELL, S.C., T.S. SULKOWSKI, C. GOCHMAN, S.J. CHILDRESS
J. Org. Chem. 27, 562 (1962)

- 71) FELIX, A.M., J.V. EARLEY, R.I. FRYER, L.H. STERNBACH
J. Heterocycl. Chem. 5, 731 (1968)
- 72) FORGIONE, A., P. MARTELLI, F. MARCUCCI, R. FANELLI,
E. MUSSINI, G.C. JOMMI
J. Chromatography 59, 163 (1971)
- 73) RUELIUS, H.W., J.M. LEE, H.E. ALBURN
Arch. Biochem. Biophys. 111, 376 (1965)
- 74) DE SILVA, J.A.F., C.V. PUGLISI
Anal. Chem. 42, 1725 (1970)
- 75) BELL, S.C., S.J. CHILDRESS
J. Org. Chem. 29, 506 (1964)
- 76) SISENwine, S.F., C.O. TIO, ST.R. SHRADER, H.W. RUELIUS
Arzneimittel-Forsch. 22, 682 (1972)
- 77) SCHILLINGS, R., ST.R. SHRADER, H.W. RUELIUS
Arzneimittel-Forsch. 21, 1059 (1971)
- 78) SADEE, W.
J. Med. Chem. 13, 475 (1970)
- 79) SCHWARTZ, M.A., P. BOMMER, F.M. VANE
Arch. Biochem. Biophys. 121, 508 (1967)
- 80) KNOWLES, H.A., W.H. COMER, H.W. RUELIUS
Arzneimittel-Forsch. 21, 1055 (1971)
- 81) BALLANTINE, J.A., C. PILLINGER
Organic Mass-Spectrometry 1, 425 (1968)
- 82) WILLIAMS, D.H., I.F. FLEMMING
Spektroskopische Methoden in der org. Chemie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2. Auflage 1971
- 83) BLEY, W., P. NUHN, G. BENNDORF
Arch. Pharmaz. 301, 444 (1968)
- 84) MANNSCHRECK, A., J. RISSMANN, F. FÖGTLE, D. WILD
Chem. Ber. 100, 335 (1967)
- 85) LINSCHIED, P., H.-M. LEHN
Bull. Soc. Chim. France 2, 992 (1967)
- 86) NUHN, P., W. BLEY
Pharmazie 22, 532 (1967)
- 87) SADEE, W.
Arch. Pharmaz. 302, 769 (1969)
- 88) JONSON, R.A., H.C. MURRAY, I.M. REINKE, G.S. FONKEN
J. Org. Chem. 34, 2279 (1969)

- 89) MARCUCCI, F., R. FANELLI, E. MUSSINI, S. GARATTINI
Europ. J. Pharmacology 7, 307 (1969)
- 90) KVĚTINA, J., F. MARCUCCI, R. FANELLI
J. Pharm. Pharmac. 20, 807 (1968)
- 91) SCHWARTZ, M.A., E. POSTMA
Biochem. Pharmacol. 17, 2443 (1968)
- 92) MARCUCCI, F., R. FANELLI, E. MUSSINI, S. GARATTINI
Biochem. Pharmacol. 19, 1771 (1970)
- 93) UDENFRIEND, S.
"Fluorescence Assay in Biology and Medicine"
Academic Press, New York 1962
- 94) GROS, P., R. RAVEUX
Chim. Ther. 4, 312 (1969)
- 95) RAVEUX, R., P. GROS
Chim. Ther. 6, 481 (1969)
- 96) ZBINDEN, G., L.O. RANDALL
Adv. in Pharmacology 5, 213 (1967)
- 97) SADEE, W., E.J. VAN D. KLEIJN
J. Pharm. Sci. 60, 135 (1971)
- 98) CONNEY, A.H., J.J. BURNS
Adv. in Pharmacology 1, 31 (1962)
- 99) REMMER, H.
"Symposium on Enzymes and Drug Action"
276 (1962) Boston, Mass.
- 100) REMMER, H., J.J. MERKER
Klin. Wschr. 41, 276 (1963)
- 101) GELBOIN, H.V., L. SOKOLOFF
Science 134, 611 (1961)
- 102) VON DER DECKEN, A., T. HULTIN
Arch. Biochem. Biophys. 90, 201 (1960)
- 103) HAWTREY, A.O., V. SCHIRREN
Biochim. Biophys. Acta 55, 785 (1962)
- 104) OMURA, R., R. SATO
J. Biol. Chem. 239, 2370 (1964)
- 105) MASON, H.S., T. YAMANO, J.C. NORTH, Y. HASHIMOTO,
P. SAKAGISHI
"Symposium on Oxidases and Related Oxidation Reduction
Enzymes". Vol. 2, p. 879, Academic Press, New York

- 106) SLADEK, N.E., G.J. MANNERING
Molec. Pharmacol. 5, 186 (1969)
- 107) DAYTON, P.G., Y. TARCAN, T. CHENKIN, M. WEINER
J. Clin. Invest. 40, 1797 (1961)
- 108) CHEN, W., P.A. VRINDTEN, P.G. DAYTON, J.J. BURNS
Life Sciences 35 (1962)
- 109) CONNEY, A.H., K. SCHNEIDMAN, M. JACOBSON, R. KUNTZMAN
Ann. N.Y. Acad. Sci. 123, 98 (1965)
- 110) GILETTE, J.R., H.A. SASAME
Federation Proc. 23, 537 (1964)
- 111) GILETTE, J.R., H.A. SASAME
Federation Proc. 24, 152 (1965)
- 112) NETTER, K.J., S. JENNER, K. KAJUSCHKE
Arch. Pharmacol. 259, 1 (1967)
- 113) NETTER, K.J., G.F. KAHL, M.P. MAGNUSSEN
Arch. Pharmacol. 265, 205 (1969)
- 114) REMMER, H., J. SCHENKMAN, R.W. ESTABROOK, H. SESAME,
S. GILETTE, S. NARASIMHULU, D.Y. COOPER, O. ROSENTHAL
Mol. Pharmacol. 2, 187 (1966)
- 115) COOPER, D.Y., S. NARASIMHULU, A. SLADE, W. RAICH,
O. FOROFF, O. ROSENTHAL
Life Science 4, 2109 (1965)
- 116) MC.INTOSH, E.N., H.A. SALHANICK
Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 552 (1969)
- 117) UELEKE, H., U. BREYER, B. BUDCZIES, S. TABARELLI,
K.-H. HELLMER
Physiol. Chem. 352, 403 (1971)
- 118) SCHWARTZ, M.A., S.J. KOLIS
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 180, 180 (1972)
- 119) HARDING, B.
University of Southern Cal. L.A.
Dept. of Biochemistry, noch zu veröffentlichen
- 120) SOLYMOSS, B., S. TOTH, S. VARGA, H.G. CLASSEN
Europ. J. Pharmacol. 10, 127 (1970)
- 121) STRIPP, B., M.E. HAMRICK, N.Z. ZAMPAGLIONE, J.R. GILETTE
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 176, 766 (1971)
- 122) AUTORENKOLLEKTIV "ORGANIKUM"
VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften
Berlin 1967, 7. Auflage

- 123) JORK, H.
Fresenius Zeitschr. f. Anal. Chem. 221, 17 (1966)
- 124) SACHS, L.
"Statistische Auswertungsmethoden"
Springer-Verlag, Berlin 1968
- 125) STERNBACH, L.H., R.I. FREYER, W. METLESICS, G. SACH,
A. STEMPFEL
J. Org. Chem. 27, 3781 (1962)
- 126) JOMMI, G., P. MANITTO, M.A. SILANOS
Arch. Biochem. Biophys. 108, 334 (1964)
- 127) STERNBACH, L.H., E. REEDER, O. KELLER
J. Org. Chem. 26, 4488 (1961)
- 128) HARAOKA, Y., T. KAMIYA, K. KARIYONE
Chem. Abs. 63, 13286 g (1965)
- 129) SULKOWSKI, T.S., S.J. CHILDRESS
J. Org. Chem. 27, 4424 (1962)
- 130) STERNBACH, L.H., S. KAISER, E. REEDER
J. Amer. Chem. Soc. 82, 475 (1960)
- 131) STERNBACH, L.H.
Chem. Abs. 54, 598 a (1960)
- 132) WALSER, A., G.L. SILVERMAN, R.I. FRYER, L.H. STERNBACH
J. Org. Chem. 36, 1248 (1971)
- 133) METLESICS, W., G.L. SILVERMAN, L.H. STERNBACH
J. Org. Chem. 28, 2459 (1963)
- 134) WALSER, A., G. SILVERMAN, J. BLOUNT, R.I. FRYER,
L.H. STERNBACH
J. Org. Chem. 36, 1495 (1971)

Ich danke den pharmazeutischen Firmen
Hoffmann-La Roche in Grenzach, Basel und Nutley, N.Y.,
Wyeth Laboratories Inc., Philadelphia, Penn.
und C.H. Boehringer, Ingelheim
für das Überlassen von Referenzsubstanzen.

Lebenslauf

Am 16.11.1942 wurde ich als Sohn des Buchhalters Alfred Schwandt und seiner Ehefrau Annemarie, geb. Heldt, in Berlin geboren.

Von 1949 bis 1955 besuchte ich die Grundschule in Berlin-Lichterfelde. Nach zwei Jahren auf der Oberschule Technischen Zweiges in Berlin-Lichterfelde wechselte ich 1957 zur Oberschule Wissenschaftlichen Zweiges in Berlin-Lankwitz, an der ich im März 1963 die Reifeprüfung bestand.

Meine Praktikantenzeit in der Wannsee - Apotheke und in der Alexandrinen - Apotheke in Berlin schloß ich mit der Pharmazeutischen Vorprüfung im März 1965 ab. Bis zu Zulassung zum Pharmaziestudium an der Technischen Universität Berlin im Wintersemester 1966 arbeitete ich als vorgeprüfter Apothekeranwärter in Berliner Apotheken. Nach zwei Semestern Pharmazie an der Technischen Universität Berlin wechselte ich zur Freien Universität, an der ich im Oktober 1969 die Pharmazeutische Prüfung ablegte.

Seit November 1969 bin ich als Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pharmazeutischen Institut beschäftigt. Seit dieser Zeit arbeite ich an der vorliegenden Dissertation.

